



# Análisis de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de vinificación

Beatriz Vallejo Estará

Diciembre, 2019

Directores

Emilia Matallana  
Agustín Aranda

Programa de Doctorado en  
Biomedicina y Biotecnología

# **Análisis de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de vinificación**



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Valencia, diciembre 2019

• • •

Tesis doctoral presentada por Beatriz Vallejo Estará para optar al  
grado de Doctora por la Universitat de València

*Beatriz V.E.*







VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



INSTITUTE FOR  
INTEGRATIVE  
SYSTEMS BIOLOGY

AGUSTÍN ARANDA FERNÁNDEZ, doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y EMILIA MATAALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València, ambos en calidad de directores de tesis,

**CERTIFICAN** que la presente Tesis Doctoral titulada “**Análisis de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de vinificación**” realizada por la graduada en Biotecnología BEATRIZ VALLEJO ESTARÁ, ha sido realizada bajo la dirección de AGUSTÍN ARANDA y EMILIA MATAALLANA en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) y en el Instituto Integrativo de Biología de Sistemas (I2SysBio, Universitat de València-CSIC), autorizando mediante este escrito la presentación de la misma para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste a los efectos oportunos y en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado:

Valencia, Diciembre de 2019

Director: Agustín Aranda Fernández

Directora: Emilia Matallana Redondo



## **Agradecimientos**

La autoría de la tesis doctoral recae principalmente en el doctorando, aunque intervienen un elevado número de personas en su realización, ya sea de manera directa o indirecta, consciente o inconscientemente. Por ello, el siguiente apartado se centra en agradecer a aquellas personas cuya aportación ha permitido la realización de esta tesis no solo a nivel científico sino también a nivel personal.

En primer lugar, a Agustín y Emilia porque me dieron la oportunidad no solo de realizar el TFG en su laboratorio sino también el TFM y esta tesis doctoral. Mi desarrollo profesional ha sido completamente bajo su tutela, tanto científica como académicamente. También cabe destacar a Helena, que también fue mi directora de TFM y siempre tuvo un hueco para explicarme las dudas. Y también de gran importancia, al antiguo Ministerio de Educación por concederme la beca FPU2014.

Durante estos cuatro años en el antiguo laboratorio 302 (IATA) y el nuevo 4.1 (I2SysBio) se ha podido disfrutar de un compañerismo enorme. Gracias a las personas que lo han hecho posible: Ceci, Marta, Max, Nubia y María. El aprendizaje de la mayor parte de las técnicas se lo debo a Ceci. Marta y su torbellino en la preparación de medios y reactivos. Nubia por su visión tanto científica como personal de la vida. Max por su tranquilidad y porque ya es una Mari Pili más. Y, por último, María, vino como estudiante de máster y se quedó como amiga.

También cabe agradecer a aquellas personas que hicieron posible la estancia. Por suerte acabé realizándola en el ISVV lo que me permitió conocer a Philippe Marullo, a quien agradezco su hospitalidad y su cierto grado de locura. De especial mención a Emilien tanto por la ayuda recibida con R (teclado español vs. francés) como por los desayunos compartidos como recompensa por ir al laboratorio los fines de semana. Porque no hay laboratorio sin un técnico, Margaux porque a pesar de no entendernos con el idioma, una mirada nos servía (King Kong).

El apoyo recibido por parte de mis amigos ha sido incalculable, tanto a aquellos científicos (Carles, Neus, Sara, Vero y Pablo), quienes comprendían perfectamente mis problemas y situaciones, como los no científicos (Luisa, Elena y Sofía), quienes, a pesar de no entenderme, me apoyaban y escuchaban.

Y, por último y más importante, a mi familia. No ha sido un camino fácil. Papá y mamá, ojalá algún día tenga vuestra fuerza. No he conocido personas más fuertes en toda mi vida. Me siento muy orgullosa de vosotros. Mi tete (el Nanet) porque, por muy despistado que sea, sé que se preocupa por mí. José, hemos crecido y madurado juntos y espero poder envejecer contigo al lado. Y, aunque parezca extraño, también a mis perras (Dana, Bali y Sira) por su amor incondicional y por sacarme a pasear todos los días.

Algún día todo esto merecerá la pena,

Beatriz Vallejo Estará





# ÍNDICE

---



<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Levaduras en el vino .....	3
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como principal levadura vínica .....	3
2.1. Ciclo celular .....	4
2.2. Cepas de laboratorio <i>versus</i> cepas vínicas .....	4
3. Fermentación del mosto de uva .....	5
3.1. Cinética de la fermentación alcohólica.....	7
3.2. Factores físicos que afectan a la vinificación .....	8
3.3. Respuesta a los estreses típicos en vinificación .....	9
3.4. Metabolitos de interés en enología producidos por <i>S. cerevisiae</i> .....	11
4. Composición de los mostos de uva naturales.....	11
5. Evolución dirigida.....	14
6. Rutas de señalización de nutrientes .....	15
6.1. Señalización por fuente de carbono.....	15
6.1.1. Ruta Ras/cAMP/PKA.....	16
6.1.2. Snf1p y los mecanismos de represión por catabolito.....	17
6.2. Señalización por Nitrógeno .....	19
6.2.1. Ruta TOR .....	20
6.2.2. Represión catabólica por nitrógeno .....	22
6.2.3. Control general de aminoácidos .....	24
6.2.4. Respuesta retrógrada.....	26
6.3. Interacción entre rutas de señalización por nitrógeno y carbono .....	27
6.4. Inhibidores químicos de las rutas de señalización por nutrientes .....	29
7. Longevidad.....	30
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1. Materiales .....	39
1.1. Cepas de microorganismos.....	39
1.2. Plásmidos.....	45
1.3. Oligonucleótidos.....	45
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	51
2.1. Bacterias .....	51
2.2. Levaduras.....	51
2.2.1. Crecimiento en condiciones de laboratorio .....	51
2.2.1.1. Crecimiento en placas multipocillo.....	51
2.2.2. Crecimiento para estudio de envejecimiento cronológico .....	52
2.2.3. Crecimiento en condiciones de microvinificación .....	52
2.2.3.1. Fermentaciones a pequeña escala para análisis fenómico .....	53
2.2.4. Condiciones de evolución dirigida.....	54
2.2.5. Esporulación y manipulación de esporas .....	54
2.2.6. Eliminación de priones con cloruro de guanidinio .....	54
2.2.7. Medida de la resistencia a estrés y sensibilidad a productos químicos .....	55
2.2.7.1. Goteos en placa .....	55
2.2.7.2. Halos de inhibición.....	55
2.2.7.3. Cultivo líquido.....	55
2.2.8. Agentes causantes de estrés e inhibidores .....	55
2.2.8.1. Estrés oxidativo.....	55
2.2.8.2. Inhibidores del metabolismo del nitrógeno.....	55
2.2.8.3. Inhibidores de la represión por glucosa.....	56
3. Métodos de manipulación genética de microorganismos.....	56
3.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	56
3.2. Construcción de mutantes de <i>S. cerevisiae</i> .....	56
3.2.1. Transformación de levaduras.....	57

4. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos .....	58
4.1. Obtención de DNA .....	58
4.1.1. DNA plasmídico bacteriano .....	58
4.1.2. DNA genómico de levadura .....	58
4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	58
4.2.1. Obtención de RNA total de levadura .....	58
4.2.2. Análisis transcriptómico .....	59
4.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	59
4.4. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	59
4.5. Secuenciación de fragmentos de DNA .....	59
5. Métodos de obtención y análisis de proteínas .....	60
5.1. Extracción de proteínas .....	60
5.1.1. Defosforilación de proteínas .....	60
5.1.2. Cuantificación de proteína total .....	61
5.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas .....	61
5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	61
5.4. Transferencia del gel ( <i>western blot</i> ) e inmunodetección de proteínas .....	61
5.5. Revelado y cuantificación .....	62
5.6. <i>Stripping</i> .....	62
6. Medida de parámetros bioquímicos .....	63
6.1. Análisis de los parámetros enológicos .....	63
6.1.1. Determinación de azúcares reductores .....	63
6.1.2. Determinación de etanol .....	63
6.1.3. Determinación de $\alpha$ -aminoácidos .....	63
6.1.4. Determinación de amonio .....	63
6.1.5. Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol .....	63
6.1.6. Determinación de cAMP .....	63
6.2. Análisis del metaboloma .....	64
6.3. Análisis de los parámetros de estrés .....	64
6.3.1. Cuantificación de trehalosa/ glucógeno .....	64
6.3.2. Cuantificación de glucosa mediante el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa .....	65
6.4. Determinación de anión superóxido .....	65
7. Técnicas microscópicas .....	65
8. Tratamiento estadístico de los datos .....	66
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>69</b>
1. Análisis de fenotipos diferenciales respecto a la señalización de nutrientes en cepas vínicas .....	69
1.1. Análisis del consumo de azúcares .....	69
1.2. Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno .....	71
1.2.1. Efecto de inhibidores químicos de la síntesis de aminoácidos en el crecimiento .....	71
1.2.2. Efecto de inhibidores químicos que causan inactivación de TORC1 en el crecimiento .....	72
1.3. Análisis del crecimiento en medios con diferentes características nutricionales y comparación con cepas de laboratorio .....	74
1.4. Análisis fenómico en condiciones de vinificación .....	77
1.5. Análisis fenómico: efecto de las condiciones en la vinificación .....	81
2. Efecto del herbicida glufosinato de amonio en vinificación .....	83
2.1. Impacto del glufosinato de amonio en la fermentación del mosto .....	83
2.2. Determinantes genéticos de la sensibilidad a glufosinato de amonio .....	85
2.3. Impacto del glufosinato de amonio en el metabolismo durante la vinificación .....	89
3. Evolución dirigida de cepas vínicas .....	93
3.1. Evolución dirigida de la cepa M2 en presencia de rapamicina .....	94
3.1.1. Selección de la cepa M2 .....	94
3.1.2. Seguimiento de la evolución .....	96

3.1.2.1. Comprobación de la identidad de las cepas evolucionadas mediante amplificación de elementos delta.....	96
3.1.3. Análisis de las distintas generaciones obtenidas durante la evolución dirigida frente a rapamicina..	98
3.1.4. Análisis de las distintas colonias obtenidas de las cepas M2 evolucionadas frente a rapamicina durante 200 generaciones.....	101
3.1.5. Efecto de la adaptación a rapamicina en condiciones de vinificación.....	103
3.1.5.1. Vinificaciones en mosto sintético MS68 y mosto natural. Evaluación de la capacidad fermentadora.....	103
3.1.6. Análisis fenómico procedente de fermentaciones estandarizadas de las cepas evolucionadas frente a rapamicina .....	105
3.1.7. Bases genéticas de la mayor tolerancia a rapamicina de las cepas evolucionadas frente a dicho compuesto.....	109
3.2. Evolución dirigida de la cepa EC1118 en presencia de 2-desoxiglucosa .....	117
3.2.1. Selección de la cepa EC1118 .....	117
3.2.2. Seguimiento de la evolución dirigida .....	119
3.2.3. Análisis de las distintas generaciones obtenidas durante la evolución dirigida frente a 2DG.....	119
3.2.4. Análisis de las distintas colonias obtenidas de las cepas evolucionadas frente a 2DG durante 200 generaciones .....	120
3.2.5. Efecto de la adaptación frente a 2DG en condiciones de vinificación.....	122
4. Estudio de la actividad de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas mediante análisis del estado de fosforilación de sus dianas .....	126
4.1. Análisis de las rutas de señalización en condiciones de laboratorio .....	126
4.1.1. Estudio de la actividad del complejo TORC1 .....	127
4.1.1.1. Análisis de la fosforilación de Rps6p .....	127
4.1.1.2. Inhibición parcial de TORC1 por glufosinato amónico durante la fermentación .....	131
4.1.1.3. Efecto de la evolución dirigida frente a rapamicina en la fosforilación de Rps6p.....	131
4.1.1.4. Análisis de la fosforilación de Par32p .....	132
4.1.2. Estudio de la represión catabólica por nitrógeno (NCR) .....	135
4.1.2.1. Análisis de la fosforilación de Gln3p .....	136
4.1.3. Estudio de la actividad de Snf1p mediante fosforilación .....	139
4.2. Análisis de las rutas de señalización en condiciones de vinificación .....	141
4.2.1. Seguimiento de la vinificación en MS60 y MS300.....	141
4.2.2. Estudio de la actividad del complejo TORC1 .....	143
4.2.2.1. Análisis de la fosforilación de Rps6p .....	143
4.2.2.2. Análisis de la fosforilación de Par32p .....	143
4.2.3. Estudio de la actividad de la represión catabólica por nitrógeno (NCR) .....	145
4.2.3.1. Análisis de la fosforilación de Gln3p .....	145
4.2.4. Estudio de la actividad de Snf1p mediante fosforilación .....	146
4.2.5. Estudio de la actividad de Ras/cAMP/PKA .....	148
4.3. Conclusión sobre el estado de las rutas de señalización durante la vinificación .....	151
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>155</b>
1. Estudio de la ruta TOR a través de la proteína quinasa Sch9p en condiciones de vinificación .....	155
1.1. Estudio transcriptómico del impacto de la delección de <i>SCH9</i> durante la vinificación.....	156
1.2. Análisis del efecto de la delección de genes de potencial interés inducidos o reprimidos durante la fermentación en el mutante <i>sch9Δ</i> .....	160
1.3. Implicación de Gcn4p en la longevidad cronológica y en la producción de glicerol en condiciones de vinificación .....	163
1.4. Implicación de Sch9p en la producción de glicerol a través de la localización y expresión de Gpd1p.....	165
1.5. Efecto de la delección de <i>SCH9</i> en la respuesta a estrés .....	168
1.6. Efecto diferencial de Sch9p y Gcn4p en el metaboloma en condiciones de vinificación .....	169
1.7. Análisis fenómico de la delección de Sch9p y de mutantes relacionados en condiciones de vinificación .....	176
2. Papel diferencial de los activadores transcripcionales Gat1p y Gln3p en condiciones de vinificación. Estudio en diversas cepas. ....	183



2.1. Estudio del papel del factor transcripcional Gln3p en diversas cepas .....	183
2.1.1. Análisis de la tolerancia del mutante <i>gln3Δ</i> frente a inhibidores químicos .....	183
2.1.2. Análisis fenómico del mutante <i>gln3Δ</i> en condiciones de vinificación .....	186
2.2. Estudio del papel del activador transcripcional <i>GAT1</i> en diversas cepas.....	191
2.2.1. Análisis de la tolerancia frente a diversos inhibidores químicos .....	191
2.2.2. Análisis fenómico del mutante <i>gat1Δ</i> en condiciones de vinificación .....	192
2.3. Análisis de la interacción entre Gat1p y Gln3p en diversas cepas .....	196
2.3.1. Análisis de la tolerancia frente a diversos inhibidores químicos .....	196
2.3.2. Análisis fenómico del mutante <i>gat1Δgln3Δ</i> en condiciones de vinificación .....	198
2.4. Reemplazamiento del alelo del gen <i>GAT1</i> .....	204
2.4.1. Análisis fenotípico de los mutantes de reemplazamiento .....	205
3. Papel de las proteínas que forman parte de las rutas de señalización de fuente de carbono. Implicación en condiciones de vinificación.....	209
3.1. Estudio de la función de <i>RGS2</i> en diversas cepas.....	209
3.1.1. Análisis de crecimiento mediante goteos en placa .....	209
3.1.2. Análisis fenómico de la delección de <i>RGS2</i> en condiciones de vinificación .....	211
3.2. Estudio del gen <i>SDC25</i> en diversas cepas .....	212
3.3. Estudio de las proteínas de unión a GTP Ras1p y Ras2p en diversas cepas .....	214
3.3.1. Comparación fenotípica frente a inhibidores químicos .....	214
3.3.2. Análisis fenómico de Ras1p y Ras2p en condiciones de vinificación .....	215
3.4. Estudio de las fosfodiesterasas Pde1/Pde2p .....	219
3.5. Comparación fenotípica de otros mutantes de delección implicados en la ruta Ras/cAMP/PKA en condiciones de vinificación .....	221
3.6. Estudio de las proteínas implicadas en la ruta SNF1 .....	225
3.7. Estudio de la respuesta retrógrada. Papel del gen <i>MKS1</i> .....	227
3.7.1. Análisis fenómico del mutante <i>mks1Δ</i> en condiciones de vinificación .....	227
3.7.2. Análisis del efecto de la delección del gen <i>MKS1</i> en diferentes cepas .....	230
3.7.2.1. Tolerancia a inhibidores químicos del mutante <i>mks1Δ</i> .....	230
3.7.2.2. Análisis del mutante <i>mks1Δ</i> en condiciones de vinificación .....	231
3.8. Integración de los fenotipos de distintos mutantes de señalización de nutrientes en la cepa C9 .....	234
4. Conclusión sobre el análisis de las rutas de señalización de nutrientes .....	241
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>245</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>249</b>
<b>ANEXO I - ABREVIATURAS.....</b>	<b>279</b>

# INTRODUCCIÓN

---



## 1. Levaduras en el vino

La producción de alimentos fermentados, como el vino, la cerveza o el pan, tuvieron y siguen teniendo una elevada repercusión en la sociedad. El proceso de fermentación de dichos alimentos permitió, en su momento, pasar de una vida nómada a una más sedentaria, ya que se disponía de alimentos en casi todas las épocas del año. De especial interés es el caso del vino, cuyas primeras evidencias arqueológicas datan del 5000 a.C., en base a la detección de ácido tartárico procedente de una tinaja antigua localizada en Mesopotamia, o bien de los restos del mosto de uva en Grecia (McGovern et al., 1996; Valamoti et al., 2007). Sin embargo, hay evidencias que datan la existencia de bebidas fermentadas similares al vino (con arroz) en China incluso en épocas todavía más tempranas, alrededor del 7000 a.C. (McGovern et al., 2004). El zumo de uva procedente del prensado se colocaba en tinajas abiertas y una vez producida la fermentación, se sellaban hasta que se abrían para el consumo del vino (Sicard y Legras, 2011). La colonización por parte de los romanos de gran parte del Mediterráneo permitió expandir la producción por toda Italia, Francia, España, Portugal e incluso el norte de África. No solo se expandió la forma de producir vino sino también el cultivo de la vid, estando la evolución de ambos procesos estrechamente ligados (Pretorius, 2000).

Sin embargo, no fue hasta 1863 cuando Louis Pasteur, basándose en observaciones microscópicas realizadas por Antoine Van Leeuwenhoek, identificó la levadura como principal responsable de la fermentación del vino. Este acontecimiento tuvo una gran repercusión para la industria enológica, ya que la identificación del microorganismo responsable de la transformación de azúcares en etanol y dióxido de carbono permitió controlar el proceso de vinificación. Otro de los hitos importantes en la industria del vino data de 1890, cuando Müller-Thurgau realizó la primera inoculación de un mosto de uva con cultivos puros. El control del proceso de obtención del vino, desde la recogida de la uva hasta el embotellado del vino, permitió aumentar tanto la calidad como la cantidad en su producción (Fleet, 1998; Marsit y Dequin, 2015; Pretorius, 2000).

## 2. *Saccharomyces cerevisiae* como principal levadura vínica

Taxonómicamente *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al reino Fungi, subreino Dikarya, filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, clase Saccharomycetes, subclase Saccharomycetidae, orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae y género *Saccharomyces*. El género *Saccharomyces* ha estado bajo reorganización continua debido al avance tanto en las nuevas técnicas de secuenciación como en el ensamblado y análisis de las mismas. La taxonomía del género *Saccharomyces* incluye actualmente 8 especies: *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, *S. paradoxus*, *S. jurei*, *S. mikatae*, *S. arboricolus* y *S. eubayanus* (Borneman y Pretorius, 2015; Dujon y Louis, 2017). Dentro del mismo género también se encuentran dos híbridos *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*) y *S. bayanus* (*S. pastorianus* x *S. uvarum*) (Dujon y Louis, 2017). Por lo general, los híbridos suelen encontrarse en ambientes industriales, como la producción de vino o cerveza, y suelen tener características beneficiosas de ambos parentales, como por ejemplo la alta capacidad fermentadora de *S. cerevisiae* y el crecimiento a bajas temperaturas de *S. eubayanus*.

## 2.1. Ciclo celular

*S. cerevisiae* puede multiplicarse tanto asexualmente mediante multiplicación vegetativa como sexualmente a través de ascosporas, de ahí su asignación al filo *Ascomycota*. La multiplicación vegetativa se lleva a cabo en condiciones óptimas de crecimiento cuando, después de la duplicación del material genético, se produce la gemación asimétrica (de ahí que se denomine levadura de gemación), donde la célula hija se separa de la célula madre mediante un septum.

Las células haploides de *S. cerevisiae* presentan dos tipos sexuales,  $a$  y  $\alpha$ , ambos codificados en el locus *MAT*. Cuando el locus *MAT* está fijado por la mutación de la endonucleasa *HO*, las cepas son heterotáticas (*ho*) y el tipo sexual se mantiene a lo largo del tiempo. Sin embargo, si es inestable, las cepas son homotáticas (*HO*) y, en este caso, las células pueden cambiar su tipo sexual para conjugarse con otra célula de tipo sexual opuesto (Bakalinsky y Snow, 1990; Thornton y Eschenbruch, 1976). Se obtendría así un individuo diploide  $a/\alpha$  que, bajo condiciones de crecimiento adversas, tras meiosis y esporulación generaría dos esporas de tipo sexual  $a$  y dos de tipo sexual  $\alpha$ . Las células homotáticas pueden cambiar su tipo sexual cuando se utiliza la copia silenciada del tipo sexual opuesto para reparar la ruptura en el locus *MAT* producida por la endonucleasa *HO*; por eso, mutaciones en la endonucleasa *HO* fijan el locus *MAT* (Strathern et al., 1982). La inestabilidad del locus *MAT* y el proceso de esporulación permiten, gracias al fenómeno conocido como renovación del genoma, la imposición en el medio ambiente de una población sobre otra. Como consecuencia de los sucesivos ciclos de reproducción vegetativa suelen acumularse mutaciones recesivas que únicamente se manifiestan cuando se produce la esporulación en condiciones adversas. En este caso, la homotalía permite la obtención de un individuo diploide a partir de dichas esporas. Parte de estos nuevos diploides pueden presentar características más adecuadas al entorno.

## 2.2. Cepas de laboratorio versus cepas vínicas

Las condiciones de crecimiento durante la fermentación alcohólica del mosto son totalmente diferentes a las condiciones de laboratorio. Mientras que las cepas industriales son capaces de fermentar completamente los azúcares presentes en el mosto, la capacidad fermentativa de las cepas de laboratorio es menor. Ello indica que, a pesar de pertenecer ambos tipos de cepas a la especie *S. cerevisiae*, mientras que las cepas vínicas han desarrollado mecanismos que les permiten hacer frente a las condiciones adversas características del proceso de vinificación, las cepas de laboratorio se han seleccionado respecto a condiciones mucho más favorables para su crecimiento.

Las cepas industriales y las aisladas de la naturaleza se caracterizan por ser protótrofas por lo que no es necesario añadir requerimientos nutricionales adicionales para su crecimiento. Es por ello que se recurre a técnicas de selección o de ingeniería genética para introducir auxotrofías necesarias para su estudio mediante estrategias basadas en transformación, generalmente en rutas de biosíntesis de aminoácidos o bases nitrogenadas, lo que permite seleccionar en el laboratorio las cepas transformadas con el marcador de selección adecuado en un medio mínimo carente de los mismos. La introducción de auxotrofías en cepas industriales puede evitarse utilizando, como marcadores de selección, genes que confieren resistencia a antibióticos como la cicloheximida (del Pozo et al., 1991) o la geneticina (Hadfield et al., 1990).



Respecto a la estabilidad del locus *MAT*, las cepas de laboratorio son heterotáticas (*ho*) y el proceso de esporulación, en el caso concreto de *S. cerevisiae*, se consigue mediante el crecimiento en un medio con acetato potásico (ver más adelante en Materiales y Métodos).

Al contrario que las cepas de laboratorio que suelen ser haploides o diploides, las cepas industriales son mayoritariamente diploides, poliploides o incluso aneuploides (Bakalinsky y Snow, 1990; Codón et al., 1995). Como consecuencia de su dotación genómica, los métodos de obtención de mutantes nulos en levaduras industriales son más lentos y laboriosos puesto que es necesario eliminar, al menos, las dos copias del gen de interés. Además, al contrario que las cepas de laboratorio, presentan un alto nivel de polimorfismo de la longitud cromosomal (Bidenne et al., 1992; Rachidi et al., 1999) lo que disminuye la capacidad de esporulación y la viabilidad de las esporas, características deficientes en las cepas industriales. Por consiguiente, la obtención de híbridos no es una alternativa fácil para la obtención de cepas industriales mejoradas. Sin embargo, junto con la mutagénesis, la fusión de protoplastos, las técnicas de transformación y recombinación de DNA y la evolución dirigida son los métodos más comunes para mejorar los aislados de cepas vínicas (Fleet, 2008). Las cepas vínicas también muestran, al contrario que las de laboratorio, un alto grado de heterocigosis (Codón et al., 1995). Esto les permite aumentar la variabilidad genética debido a que pueden llevar a cabo una reorganización de sus cromosomas durante el crecimiento mitótico (Longo y Vezinhet, 1993; Puig et al., 2000).

Diversos trabajos (Borneman et al., 2008; Novo et al., 2009) en los que se ha comparado el genoma de cepas industriales con el de la cepa de laboratorio de referencia S288c han demostrado que las cepas industriales presentan alrededor de 100 kb adicionales. Dichas secuencias codifican proteínas de hongos relacionadas con la pared celular y con el consumo de aminoácidos; características que podrían explicar la buena capacidad fermentativa de las cepas vínicas. Esas secuencias procedentes de las primeras secuenciaciones completas de cepas vínicas son las primeras evidencias que han revelado la presencia de transferencia horizontal de genes pudiendo explicar la adaptación a las condiciones de vinificación (Novo et al., 2009).

Las cepas industriales utilizadas como iniciadoras de la fermentación alcohólica del vino se han seleccionado principalmente a partir de dos nichos ecológicos: el viñedo y las fermentaciones espontáneas producidas en la bodega (Fleet, 2008). Esa divergencia en el origen de las cepas puede explicar las diferentes respuestas a los cambios ambientales que presentan. Las cepas de laboratorio, que se han propagado como cultivo puro en el laboratorio durante diversas décadas, se han ido seleccionando según su crecimiento en medios con abundancia de nitrógeno y temperatura óptima; mientras que las cepas vínicas se han seleccionado en función de la capacidad de hacer frente a las condiciones ambientales adversas, en el caso del vino, la baja concentración de nitrógeno presente en el mosto o el estrés osmótico causado por las elevadas concentraciones de azúcares (Pizarro et al., 2007).

### 3. Fermentación del mosto de uva

En términos generales, el proceso de producción del vino se inicia con el prensado mecánico de la uva, previa eliminación de restos vegetales como ramas y hojas. A continuación, el mosto de uva es introducido en tanques de fermentación, donde se puede proceder a una fermentación espontánea o a inocular una levadura iniciadora, principalmente en forma de levadura seca activa (LSA). La fermentación alcohólica del mosto es llevada a cabo

principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mientras que *Oenococcus oeni* es la principal bacteria láctica responsable de la fermentación maloláctica. Ambos organismos se caracterizan por soportar altas concentraciones de etanol y ser capaces de optar por un metabolismo fermentativo (Borneman et al., 2013; Jackson, 2000). Sin embargo, el proceso de producción del vino es microbiológicamente muy complejo debido a la interacción entre levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y otros grupos bacterianos, incluso bacteriófagos, ya que todos ellos contribuyen a la calidad del producto final (Fleet, 1998).

Tradicionalmente, el proceso de producción del vino de manera espontánea se ha llevado a cabo gracias a la presencia de las levaduras presentes en la superficie de las uvas y en el ambiente de la bodega. A pesar de que *S. cerevisiae* es la levadura del vino por excelencia, se encuentra en baja proporción en la superficie del grano de uva. Las principales levaduras que pueden encontrarse pertenecen a los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora* y, en menor medida, *Candida*, *Metschnikovia*, *Cryptococcus*, *Pichia* y *Kluyveromyces* (Fleet, 1998; Ribéreau-Gayon et al., 2005). El crecimiento de esta gran diversidad de microorganismos produce una alta heterogeneidad en las características organolépticas del vino. Este tipo de levaduras alcanza su máximo de crecimiento ( $10^6$ - $10^7$  u.f.c./mL) en los primeros días de fermentación, momento a partir del cual empiezan a morir como consecuencia del alto contenido en etanol producido por *Saccharomyces*. Sin embargo, *Saccharomyces* no sólo se implanta como consecuencia de su mayor resistencia a altas concentraciones de etanol, sino por las condiciones de anaerobiosis, la mayor resistencia a los sulfitos añadidos al mosto después de la vendimia, al estrés osmótico producido como consecuencia de la elevada concentración de azúcares reductores y la tolerancia a altas temperaturas (Fleet, 1998; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Por norma general, el mosto suele inocularse con  $1 \cdot 10^6$  células/mL de LSA rehidratada durante aproximadamente 30 minutos en agua templada a 37 °C. Trabajos previos en nuestro laboratorio han llevado a cabo la caracterización y mejora de los procesos de propagación y deshidratación de biomasa de levaduras, tanto de la especie *S. cerevisiae* como de otras levaduras vínicas no convencionales (Gamero-Sandemetrio et al., 2015, 2018; Garre et al., 2010; Gómez-Pastor et al., 2010a,b; Pérez-Torrado et al., 2005, 2009).

La propagación de la LSA se realiza en melazas procedentes del refinamiento del azúcar de remolacha o de caña debido a su alto contenido en sacarosa y su bajo coste económico, pues es un subproducto de desecho industrial. El proceso de propagación de la LSA conlleva alrededor de 3-5 días dado que se realiza un crecimiento previo a escala de laboratorio y se va escalando en una secuencia de fermentadores hasta obtener la cantidad deseada. Finalmente, se opta por una etapa de maduración que consiste en que las levaduras terminen de consumir todos los nutrientes y entren en fase estacionaria. A continuación, la biomasa obtenida sufre un proceso de deshidratación llevado a cabo principalmente con un secador de lecho fluidizado, donde la temperatura y la velocidad de secado juegan un papel importante para la resistencia de la levadura a la deshidratación y rehidratación posterior.

La inoculación del mosto de uva con levaduras seleccionadas en forma de LSA favorece la obtención de manera consistente y reproducible de un producto con características apropiadas y muy similares entre cosechas de años diferentes. Además, el uso de levaduras como inóculo del mosto permite acortar la fase de latencia y el tiempo de fermentación, disminuyendo así la probabilidad de contaminación del mosto y de paradas en la fermentación o fermentaciones excesivamente lentas (Bauer y Pretorius, 2019). Sin embargo, aunque el uso de inóculos permite obtener una fermentación más predecible y rápida, las fermentaciones

realizadas de forma espontánea permiten obtener vinos con características enológicas más complejas e interesantes debido a la gran diversidad de especies de levadura implicadas en el proceso (Fleet, 1998), con lo que ambas aproximaciones conviven en la enología moderna.

La selección del inóculo para que se produzca la fermentación alcohólica del mosto de manera adecuada es de gran importancia. La principal característica que debe cumplir la cepa de levadura seleccionada es que sea capaz, no solo de resistir, sino de crecer y permanecer activa metabólicamente, en las condiciones adversas que se producen durante la vinificación. Otras características que debe cumplir son: fermentación vigorosa con fases de latencia cortas, poco azúcar residual (lo que evita contaminaciones postproducción), fermentación reproducible, tolerante a temperaturas subóptimas de crecimiento, resistente a elevadas concentraciones de etanol y a dióxido de azufre (añadido como antioxidante y antimicrobiano) y alta producción de glicerol y  $\beta$ -glucosidasas para conseguir un aroma adecuado del producto final. También son características deseables la baja producción de espuma, la actividad *killer* y niveles adecuados de ciertas enzimas líticas y metabólicas (Aranda et al., 2011; Fleet, 2008).

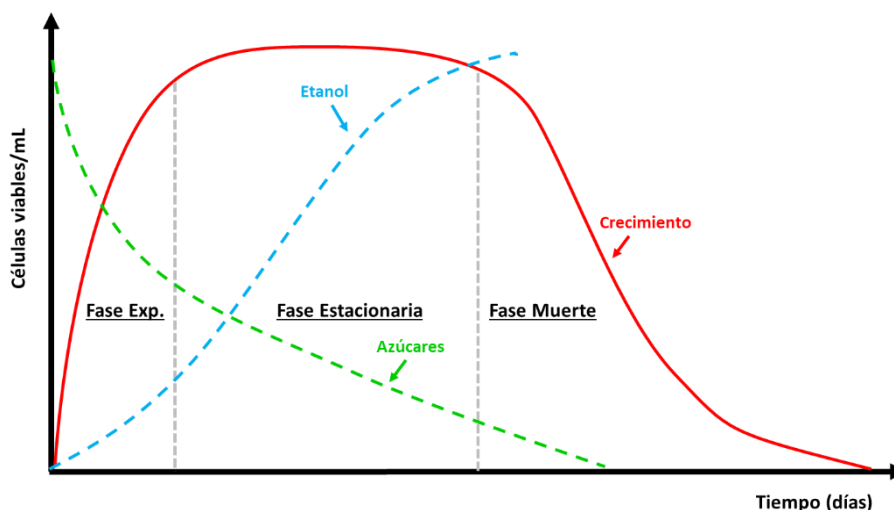
Aunque la levadura por excelencia utilizada como inóculo sigue siendo *S. cerevisiae*, el uso de otras levaduras, conocidas genéricamente como no-*Saccharomyces* o no convencionales, ha ido en aumento en los últimos años. Estas levaduras influyen beneficiosamente en la liberación de aromas gracias a la presencia de actividades enzimáticas particulares (revisión en Jolly et al., 2014; Belda et al., 2017). Por lo general, suelen inocularse al inicio de la fermentación alcohólica con el objetivo de aumentar la diversidad de aromas del producto final y *S. cerevisiae* se inocula más tarde con el propósito de finalizar por completo la fermentación alcohólica (Fleet, 2008; Jolly et al., 2014).

### 3.1. Cinética de la fermentación alcohólica

La producción del vino es un proceso discontinuo tipo *batch* por lo que la disponibilidad de nutrientes va disminuyendo conforme avanza la fermentación alcohólica. Como cualquier otro tipo de crecimiento microbiano, la cinética de fermentación de un proceso en *batch* presenta 4 fases principales: latencia (*lag*), exponencial o logarítmica, estacionaria y muerte. La fase *lag* se caracteriza por la adaptación y aclimatación al nuevo medio. Una vez las células están adaptadas a las nuevas condiciones, empiezan a dividirse por lo que la población de células viables se incrementa exponencialmente hasta alcanzar su valor máximo. En este tipo de fermentaciones en las que no se produce aporte de medio fresco, el cultivo entra en una fase estacionaria, que se caracteriza por una parada del crecimiento por agotamiento de ciertos nutrientes y acumulación de productos procedentes del metabolismo que pueden ser tóxicos para las células. En la última fase, la velocidad de muerte supera a la velocidad de división (Ribéreau-Gayon et al., 2005).

En el caso de la fermentación alcohólica del vino existen algunas diferencias en la cinética de crecimiento, Figura 1 (Jackson, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2005). Normalmente la fase *lag* es despreciable respecto a la larga duración de la fermentación, la fase exponencial es relativamente corta (no más de 8 divisiones cuando se inocula con LSA), la fase estacionaria comienza antes de que todos los nutrientes se agoten; y la fase de muerte es atípicamente larga ya que las células pueden mantenerse metabólicamente activas y viables por largos periodos de tiempo. Hasta el 40 % del azúcar consumido y metabolizado a etanol se produce durante la fase de muerte (Ribéreau-Gayon et al., 2005) y el grueso de la fermentación se produce en condiciones estacionarias donde la división celular está ausente. La brevedad de la fase de latencia puede deberse a que las células se preadaptan antes del inóculo como consecuencia de utilizar LSA y a que en su producción se favorece la acumulación de

carbodidratos de reserva en la etapa final de maduración de la biomasa. La LSA procede de cultivos en medio aerobio por lo que tienen mitocondrias funcionales, son capaces de respirar, pero a la vez disponen de un gran conjunto de enzimas fermentativas. Por ello, el cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo en el mosto es muy rápido (Ribéreau-Gayon et al., 2005).



**Figura 1.** Curva de crecimiento típica de la levadura *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación alcohólica del mosto de uva. Adaptado de Busti et al., 2010.

A diferencia de otros procesos industriales donde el objetivo es obtener un crecimiento elevado de la levadura, durante la fermentación alcohólica del mosto es necesario, no solo obtener un crecimiento moderado, sino que las levaduras estén activas metabólicamente, puesto que la mayor parte del consumo de azúcares se produce durante la fase estacionaria. Por ello, el éxito de *S. cerevisiae* se debe a su potencial metabólico, el cual aumenta la concentración de etanol e inhibe el crecimiento de otras levaduras no-*Saccharomyces*, y no a un gran aumento del número de células.

### 3.2. Factores físicos que afectan a la vinificación

Los principales factores fisicoquímicos que afectan al crecimiento y la eficiencia fermentativa de *S. cerevisiae* durante la vinificación son la temperatura, el oxígeno, el pH, el CO<sub>2</sub> y la clarificación. La temperatura es quizá el factor físico más importante durante la vinificación ya que afecta a ambos parámetros y, por tanto, influye en qué tipo de levadura se impone. Aunque *S. cerevisiae* presenta una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30 °C, su rango es muy amplio. Sin embargo, las levaduras no-*Saccharomyces* prevalecen mejor a bajas temperaturas (alrededor de 20 °C) (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Por lo general, las vinificaciones no suelen realizarse a temperaturas mayores de 30 °C puesto que, aunque *S. cerevisiae* puede crecer sin problemas, aumenta la toxicidad del etanol y la evaporación de compuestos volátiles de gran importancia enológica (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Aunque no existe una temperatura determinada para realizar las vinificaciones, ya que ésta depende de la cepa utilizada para la fermentación alcohólica, sí que existe diferencia entre el tipo de vino a obtener. Por ejemplo, la fermentación en vinos tintos suele iniciarse a 18-20 °C e ir incrementando la temperatura de forma progresiva hasta 32 °C. Esto se debe a que la levadura suele ser más sensible a la temperatura durante las fases de latencia y crecimiento exponencial y más resistente al final de la fermentación donde las elevadas temperaturas

favorecen la maceración, favoreciendo la extracción de compuestos fenólicos de la piel de la uva. Respecto al vino blanco, el rango de temperaturas suele ser entre 10-18 °C, favoreciendo no solo la conversión de aromas (principalmente afrutados), sino también la influencia de levaduras no-*Saccharomyces*, cuyo rango de temperaturas óptimas es más bajo que *S. cerevisiae* (Aranda et al., 2011; Jolly et al., 2014; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

El aumento global de temperatura causado por el cambio climático retrasa la madurez fenólica de la uva (taninos y antocianinos) respecto de la acumulación de azúcares fermentables, que determinará el contenido en alcohol del vino (Jones et al., 2005). Si se espera a que se produzca la madurez fenólica de la uva, el elevado contenido en azúcares genera vinos con excesivo grado alcohólico. Para solucionar el problema se recurre, entre otras estrategias, a determinar el mejor momento para la recogida de la uva o a realizar la fermentaciones a bajas temperaturas para ralentizar el metabolismo fermentativo, lo que también favorece el crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces* (Alonso-del-Real et al., 2017), que son más criotolerantes.

*S. cerevisiae* es considerado un organismo anaerobio facultativo, capaz de consumir los azúcares en ausencia de oxígeno. Sin embargo, el oxígeno es otro factor a tener en cuenta durante la fermentación ya que se requiere durante el crecimiento de *S. cerevisiae* para la síntesis de esteroides (principalmente ergosterol) y ácidos grasos saturados, favoreciendo así la correcta fluidez de la membrana para hacer frente a las condiciones tan adversas que se producen durante la fermentación del mosto de uva. Así como la ausencia total de oxígeno no es adecuada, tampoco lo es el exceso, ya que favorece la producción de acetaldehído y sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). No obstante, una alta aireación puede ser beneficiosa en mostos con bajo contenido en nitrógeno para favorecer la utilización de prolina, presente en altas concentraciones en el mosto de uva y cuyo catabolismo requiere oxígeno (Carrascosa et al., 2011; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

El pH del mosto suele variar entre 2.75 y 4.2. Estos valores de pH tan bajos favorecen la hidrólisis de la sacarosa presente en el mosto y previenen su contaminación (Carrascosa et al., 2011; Ribéreau-Gayon et al., 2005). Y por último, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), procedente de la fermentación de los azúcares, favorece la correcta dispersión de nutrientes a través del mosto gracias a las corrientes producidas; sin embargo, también produce daños en la membrana celular afectando a la viabilidad de las levaduras (Carrascosa et al., 2011).

### 3.3. Respuesta a los estreses típicos en vinificación

Como ya se ha comentado, la fermentación alcohólica del mosto es un proceso en continuo por lo que, al no haber aporte continuo de nutrientes, las condiciones varían a lo largo del proceso. Además, es de gran importancia conocer la respuesta a la abundante y cambiante presencia de condiciones de estrés, tanto procedentes del medio de cultivo inicial, como el estrés osmótico, como producidas por la acumulación de productos procedentes del metabolismo fermentativo, como el etanol y el acetaldehído. Los principales estreses a los que se ven sometidas las levaduras a lo largo de la fermentación son: estrés osmótico, bajo pH, variaciones de temperatura, elevados niveles de etanol y el agotamiento de ciertos nutrientes. Las levaduras deben hacer frente a dichos estreses manteniendo una alta viabilidad celular para poder finalizar la fermentación completando el consumo de azúcares.

La elevada concentración de azúcares presentes en el medio, además de producir estrés hiperosmótico, reprime la respiración por lo que el crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación depende de un metabolismo principalmente fermentativo. A diferencia de otros



tipos de estrés, el estrés osmótico se produce nada más inocular el mosto, por lo que las levaduras deben hacerle frente en la fase de latencia. La correcta adaptación a este tipo de estrés determina la eficiente imposición de la levadura en la fermentación. La respuesta principal al estrés hiperosmótico es la activación de la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) y, como consecuencia, la activación de la transcripción de genes que codifican el importe de glicerol (*STL1*), un aumento en la producción de glicerol (*GPD1/GPD2*) y la exportación de glicerol a través de la membrana plasmática (*FPS1*). El estrés osmótico también induce la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ribosomas y aumenta la actividad de las rutas glicolítica y de los fosfatos de pentosa (Marks et al., 2008). El estrés osmótico se disipa conforme avanza la fermentación y los azúcares van disminuyendo, al tiempo que aumenta la concentración de etanol.

La expresión génica que se produce en la fase estacionaria es de gran interés ya que, como se ha comentado anteriormente, la mayor parte de la fermentación alcohólica se produce en esta fase. En dicha fase, los estreses están relacionados con el ayuno de nutrientes (principalmente nitrógeno) y la acumulación de productos tóxicos de la fermentación, como el etanol. Estos cambios en el medio inducen mecanismos de respuesta, tanto transcripcional como postranscripcional, que dan lugar a cambios en la expresión génica de un elevado número de genes implicados en una gran diversidad de procesos celulares (Marks et al., 2008). La entrada en la fase estacionaria es un proceso complejo y altamente regulado. Por lo general, la entrada en la fase estacionaria se inicia como consecuencia del agotamiento de uno o más nutrientes en el medio, la fuente de carbono en medio de laboratorio y la de nitrógeno en condiciones de vinificación. Se ha descrito que, aunque el agotamiento de nutrientes en ambas condiciones difiere, la entrada en la fase estacionaria se caracteriza por la inactivación de las rutas Ras/cAMP/PKA y TOR (revisado en Herman, 2002) y, como consecuencia, la activación de la quinasa Rim15p (Roosen et al., 2005). Dichas rutas inducen el crecimiento y la proliferación celular en presencia de nutrientes y, cuando éstos son escasos, su inactividad provoca la parada del crecimiento y la consecuente activación de los mecanismos de protección celular (Carrascosa et al., 2011).

La elevada concentración de etanol (11-14 %) procedente de la fermentación alcohólica causa un elevado estrés a la levadura, ya que afecta tanto a su metabolismo como a su crecimiento. Su principal consecuencia es el aumento de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, ya que se intercala en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, lo que aumenta el influjo pasivo de iones, principalmente protones. Para contrarrestar la acidificación producida por el etanol, la ATPasa vacuolar y de la membrana plasmática juegan un papel muy importante. La ATPasa vacuolar ayuda a mantener el pH intracelular bombeando protones del citoplasma al lumen (Inoue et al., 2005). Otro de los efectos observados como consecuencia de la modificación de la membrana es la síntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs, *Unsaturated Fatty Acids*) y ergosterol (Vanegas et al., 2012; You et al., 2003).

El mantenimiento de la estructura de las membranas y proteínas es de gran importancia para la viabilidad celular y para ello, bajo estrés por etanol, se induce tanto la expresión de proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*), como la biosíntesis de trehalosa (Lucero et al., 2000). Las HSPs actúan como cochaperonas, evitando la desnaturalización de las proteínas. La biosíntesis de aminoácidos también está implicada en la respuesta al estrés por etanol. Además, se ha demostrado que la prolina está implicada en la estabilización de proteínas y membranas ya que inhibe la agregación de proteínas durante el plegamiento (revisado en Ma y Liu, 2010).

El conjunto de todos los genes cuyos cambios de expresión tienen importancia para que la fermentación alcohólica pueda finalizar en el tiempo adecuado se conoce como “fermentoma” (Walker et al., 2014). Este conjunto de genes identifica las respuestas moleculares, comentadas en los párrafos anteriores, que se producen como consecuencia de los diversos estreses producidos durante la fermentación. El fermentoma se ha ido actualizando, añadiendo otras condiciones adversas típicas de la fermentación del mosto como es el ayuno de nitrógeno (Peter et al., 2018).

### 3.4. Metabolitos de interés en enología producidos por *S. cerevisiae*

Los productos principales obtenidos de la fermentación alcohólica de los azúcares del mosto son el CO<sub>2</sub> y el etanol. Sin embargo, existen otros subproductos procedentes del metabolismo de *S. cerevisiae* que, pese a ser producidos en menor cantidad, como el glicerol o el ácido acético son importantes en el vino. El segundo metabolito, por su cantidad y su implicación en el cuerpo y en el dulzor del vino, es el glicerol (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Las estrategias actuales para aumentar la síntesis de glicerol se basan en seleccionar cepas sobreproductoras o mejorar las ya existentes. Sin embargo, debido a la compleja relación entre el metabolismo del glicerol y otras rutas, la sobreproducción de glicerol produce un desequilibrio en el balance redox celular (Cambon et al., 2006), que conlleva la formación de otros productos secundarios indeseables, como el ácido acético, principal ácido volátil del vino. El ácido acético, aunque también es producido durante la fermentación, siempre se ha asociado al deterioro de la uva o del mosto por ácidobacterias por lo que es considerado un compuesto organoléptico perjudicial; su umbral de detección depende de la variedad de uva y del tipo de vino. Tanto la síntesis de glicerol como la de etanol están directamente relacionadas con la concentración de azúcares en el mosto, cuanto más azúcares haya, más metabolitos procedentes de la respuesta a estrés, como el glicerol, o de la propia fermentación alcohólica, como el etanol, se producen (Bauer y Pretorius, 2019). El acetaldehído es el compuesto intermediario entre el piruvato y el etanol e influye en el aroma afrutado, pero en niveles elevados produce un sabor indeseable a hierba o manzana verde. Es capaz de reaccionar con otros compuestos, como el dióxido de azufre disminuyendo su efectividad, o con los taninos modificando la astringencia del vino o el color del mismo (Dzialo et al., 2017).

La evaluación organoléptica de los vinos se realiza mediante el sabor, el aroma y las propiedades visuales; siendo el aroma el más importante. El aroma de los vinos es muy variable en función de la variedad de uva, las especies que llevan a cabo las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y las condiciones de envejecimiento o almacenaje. Los principales grupos de compuestos aromáticos procedentes del metabolismo de *S. cerevisiae* son ácidos grasos volátiles, alcoholes superiores, ésteres, compuestos carbonilados, fenoles volátiles y compuestos del azufre (Lambrechts y Pretorius, 2019). Los compuestos procedentes del metabolismo que tienen una contribución negativa en el aroma son acetaldehído, ácido acético, etil acetato, algunos alcoholes superiores cuando alcanzan concentraciones elevadas y compuestos del azufre, sulfatos orgánicos y tioles (Carrascosa et al., 2011).

## 4. Composición de los mostos de uva naturales

La composición del mosto de uva presenta todo lo necesario para el crecimiento de *S. cerevisiae*, aunque no en las proporciones óptimas. Además, la composición del mosto es variable de año en año, lo que influye directamente en el producto final y en el crecimiento de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Como ya se ha comentado, también hay que

tener en cuenta la acumulación de productos tóxicos durante el proceso de vinificación, ya que al tratarse de un cultivo en continuo los nutrientes van consumiéndose por lo que pueden llegar a ser limitantes.

En términos generales, el mosto contiene de más a menos proporción: agua, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, polifenoles, sales minerales, lípidos y pesticidas. Aunque existen otros azúcares presentes, la glucosa y la fructosa (en cantidades equimolares) son los más abundantes en el mosto. La concentración de azúcares suele encontrarse entre 170-220 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Concentraciones de azúcares superiores a 250 g/L inhiben el crecimiento de *S. cerevisiae* como consecuencia de la elevada presión osmótica y del etanol producido como consecuencia de la fermentación alcohólica. Los ácidos orgánicos son los segundos compuestos más abundantes, entre 9 y 27 g/L (Ough, 1992). Los ácidos tartárico y málico constituyen hasta el 90 % mientras que el cítrico y el ascórbico se encuentran en menor proporción.

La fuente de nitrógeno es quizá uno de los factores más importantes a tener en cuenta en la composición del mosto ya que suele ser un nutriente limitante para el crecimiento de *S. cerevisiae* y su disminución es la causa principal de paradas en la fermentación o fermentaciones excesivamente lentas (*stuck or sluggish*) (Bisson, 1999; Blateyron y Sablayrolles, 2001). Los principales compuestos nitrogenados son: amonio (3-10 %), aminoácidos (25-30 %), polipéptidos (25-40 %) y proteínas (5-10 %) (Carrascosa et al., 2011). La proporción y la cantidad de éstos varían en función de diversos factores, como la variedad y la maduración de la uva, la infección por hongos o la adición de fertilizantes, por lo que también influyen en el crecimiento, la velocidad de fermentación y la tolerancia a etanol de *S. cerevisiae*. También pueden encontrarse en menor proporción pequeñas concentraciones de nitrato, nucleótidos, aminos y vitaminas.

En condiciones de vinificación, se hace referencia al término YAN (*Yeast Assimilable Nitrogen*) para definir la concentración de nitrógeno asimilable por la levadura, ya que *S. cerevisiae* no puede asimilar fuentes de nitrógeno inorgánicas (nitratos y nitritos), ni tampoco proteínas ni polipéptidos. Por lo tanto, el término YAN engloba las concentraciones tanto de amonio como de aminoácidos, las fuentes de nitrógeno preferidas de *S. cerevisiae* (Henschke y Jiranek, 1993; Ough y Amerine, 1988). La prolina, a pesar de ser un compuesto abundante en el mosto, no es fácilmente metabolizada por *S. cerevisiae* debido a que se requiere oxígeno para su catabolismo y, por tanto, no es considerada en el cálculo del YAN. Aunque también depende de la concentración de azúcar, se considera que una concentración de nitrógeno asimilable por debajo de 140 mg/L (Bely et al., 1990) puede perjudicar la fermentación y que concentraciones por debajo de 25 mg/L deben evitarse por completo. Como procedimiento habitual en la bodega para evitar paradas o ralentizaciones en la fermentación, se determina la concentración de nitrógeno asimilable y se suplementa el mosto con fosfato o sulfato de diamonio para prevenir el ayuno de nitrógeno. Diversos estudios han demostrado que esta suplementación, y el momento en el que se realiza, influyen en el rendimiento de biomasa y la fermentación (Beltran et al., 2005; Bely et al., 1990). La excesiva adición de fuente de nitrógeno puede causar un aumento de etil carbamato, compuesto indeseable en el vino. Las vitaminas son otros de los compuestos nitrogenados a tener en cuenta, en concreto, la biotina ya que es la única vitamina que las levaduras no pueden sintetizar.

Los polifenoles también son importantes puesto que determinan características organolépticas del vino. Algunos, como las quinonas, actúan como antioxidantes. Respecto a

las sales minerales, los cationes más usuales son potasio, sodio, calcio y magnesio; y los aniones, cloratos, fosfatos y sulfatos (Carrascosa et al., 2011). En relación con los lípidos, normalmente están presentes en el mosto y son especialmente necesarios para hacer frente a las concentraciones elevadas de etanol. Y, por último, los sulfitos, como el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), el cual suele añadirse al mosto como antimicrobiano, restringe el crecimiento bacteriano, y como antioxidante, evitando así la pérdida de color (Carrascosa et al., 2011; Fugelsang, 1997).

Debido a la heterogeneidad de los mostos naturales, en el laboratorio suelen utilizarse mostos sintéticos que simulan su composición (Riou et al., 1997), principalmente en el contenido en azúcares y nitrógeno. De esta forma, al hacer uso de un medio totalmente definido, la reproducibilidad de los experimentos es mayor permitiendo analizar cambios específicos en la composición del medio que pueden afectar tanto a la cinética de la fermentación como a las propiedades organolépticas del vino.

La mayoría de los experimentos en condiciones de laboratorio se realizan en medios de cultivo que, ya sean mínimos o ricos, tienen composiciones nutricionales muy diferentes a los mostos de uva o sintéticos, tal y como se muestra en la Tabla 1. Una de las principales diferencias es que en los medios de laboratorio el nutriente limitante suele ser la fuente de carbono (por lo general glucosa) mientras que en el mosto suele ser la fuente de nitrógeno.

**Tabla 1.** Diferencias entre medios y condiciones de cultivo de laboratorio y de vinificación. Modificado de Pizarro et al., (2007).

CONDICIONES		Laboratorio		Fermentación Alcohólica	
Medio	Mínimo (SC)	Completo (YPD)	Mosto Sintético	Mosto Natural	
Fuente de Carbono		Glucosa (20 g/L)	Glucosa/Fructosa (1:1, 200 g/L)	Glucosa/Fructosa, entre otros (220 g/L*)	
Fuente de Nitrógeno	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5 g/L)	Peptona Bacteriológica (20 g/L) Extracto de Levadura (10 g/L)	YAN (300 mg/L)	YAN (250 mg/L)**	
Presión Osmótica		Baja		Alta	
pH	± 5	± 6.5	± 3.4	± 3-4	
Oxígeno		Aireación		Aireación limitada	
Etanol		Bajo		Alto	
Temperatura		Óptima	Temperatura Subóptima		
			Vino blanco: 10-15 °C		
			Vino tinto: 18-25 °C		
Metales Tóxicos		No	No	Cobre	
Xenobióticos		No	No	Si	
Ecología Microbiana		Estéril	Estéril	No estéril	
SO <sub>2</sub>		No	No	40-100 mg/L	
Duración		± 1 día	± 7 días	Vino blanco: 15-30 días	
				Vino tinto: 6-10 días	

\* Valores medios.

\*\* Valores estándar suplementando el mosto con fosfato de diamonio. El valor depende de la concentración de azúcares.

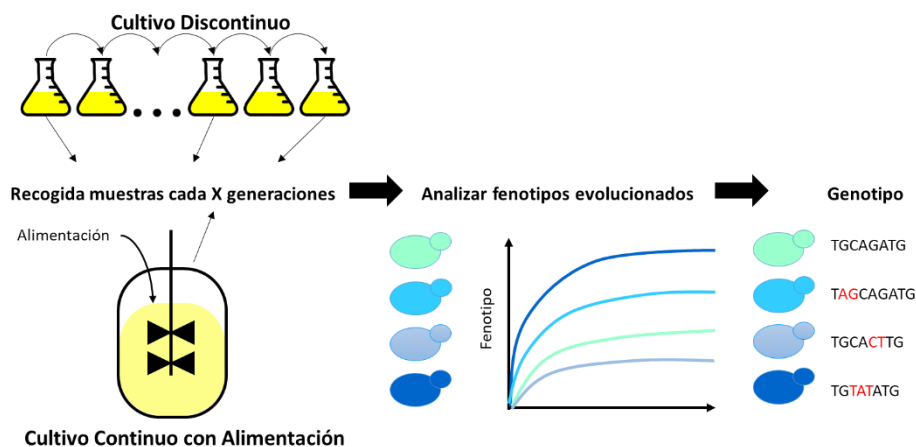
## 5. Evolución dirigida

La industria del vino debe hacer frente a las problemáticas ambientales actuales y a las demandas del consumidor, relacionadas con la economía, la salud y la calidad del vino (Goold et al., 2016). En primer lugar, en ciertos países se aplican impuestos más elevados a bebidas con mayor contenido alcohólico dando lugar a vinos con precios más elevados. En segundo lugar, la sociedad está cada vez más concienciada sobre el efecto nocivo de las bebidas alcohólicas en la salud. Y, por último, un elevado contenido alcohólico puede afectar negativamente a las propiedades sensoriales del vino (Gawel et al., 2007a,b). Por ello, la tendencia actual es el consumo de vinos con menor grado alcohólico, más dulces y con aromas afrutados.

Sin embargo, y como consecuencia del cambio climático, las elevadas temperaturas aumentan la concentración de azúcares en la uva dando lugar a vinos con mayor contenido alcohólico (Borneman et al., 2013). Adelantando la vendimia se recogen uvas con menor concentración de azúcares, sin embargo, la madurez fenólica de la uva no se ha producido y, por tanto, el producto obtenido no es de calidad ya que disminuye su complejidad aromática. Por ello, una alternativa para la obtención de vinos con menor grado alcohólico es el uso de cepas de levaduras con rendimientos de etanol más bajos, utilizando híbridos que presenten características de interés o bien levaduras no-*Saccharomyces* (Dequin et al., 2017; Steensels et al., 2014; Su et al., 2019; Tronchoni et al., 2018). Aunque las estrategias que se llevan a cabo mediante ingeniería genética dan resultados prometedores, hoy en día, la opinión pública europea no facilita la utilización de organismos modificados genéticamente (OMG).

La evolución dirigida es una de las estrategias que más atención está obteniendo en los últimos años puesto que permite obtener cepas mejoradas, bien más resistentes a un estrés determinado o bien sobreproductoras de un compuesto específico, que no son consideradas OMG, por lo que pueden aplicarse en la industria. La evolución dirigida consiste en hacer crecer una población de microorganismos cientos de generaciones en una condición estresante o limitante determinada, y recoger muestras cada cierto número de generaciones para poder comparar con la cepa parental inicial (Zeyl, 2004). La evolución dirigida puede realizarse en cultivos líquidos en continuo con retroalimentación o bien en discontinuo, dependiendo del objetivo del proceso (Figura 2), ya que ambas estrategias permiten introducir la condición con la que se pretende dirigir la evolución. El crecimiento en continuo permite mantener constantes las condiciones de crecimiento añadiendo medio de cultivo fresco y simula mejor las condiciones ambientales estresantes presentes en la naturaleza; mientras que en el crecimiento en discontinuo parte de la población se utiliza para inocular de nuevo el mismo medio fresco. Aplicado a las condiciones de vinificación, cada proceso tiene sus ventajas y desventajas. El cultivo en continuo permite reducir el tiempo del experimento pues las células se encuentran siempre en fase exponencial; sin embargo, no reproduce las condiciones de vinificación, donde las concentraciones de nutrientes disminuyen y la de los productos tóxicos aumentan (Mcbryde et al., 2006). Una vez realizado el experimento de evolución dirigida, debe analizarse el fenotipo obtenido respecto de la cepa inicial, con el objetivo de observar si se ha mejorado la característica de interés. La colonia seleccionada con el fenotipo de interés debe ser analizada en profundidad para conocer qué posibles mutaciones se han producido y cómo actúa frente al proceso industrial en el cual se pretendía mejorar el comportamiento. Diversos trabajos han utilizado la evolución dirigida para la obtención de cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer en xilosa, más tolerantes a etanol y a

altas temperaturas y productoras de glicerol (Caspeta et al., 2016; Kutyna et al., 2012; Stanley et al., 2010; Tomás-Pejó et al., 2010).



**Figura 2.** Proceso de evolución dirigida tanto en cultivo discontinuo como en cultivo continuo con alimentación.

## 6. Rutas de señalización de nutrientes

*S. cerevisiae* depende de la disponibilidad de nutrientes en el medio para su supervivencia. Por ser un organismo unicelular, las células deben ser capaces de detectar los nutrientes (*sensing*), transmitir la señal de presencia o ausencia al interior celular (*signalling*) y llevar a cabo las modificaciones transcripcionales y traduccionales consecuentes para ajustar su crecimiento y su viabilidad a las condiciones ambientales (Zaman et al., 2008).

Existen múltiples rutas de señalización de nutrientes en *S. cerevisiae* siendo las principales: Ras/cAMP/PKA (Protein Kinase A), SNF1 (*Sucrose Non-fermenting*), TOR (*Target of Rapamycin*) y GAAC (*General Amino Acid Control*). Estas rutas responden principalmente a la presencia o ausencia de un nutriente específico o una clase de nutrientes, sin embargo, numerosos estudios han demostrado que existe una comunicación cruzada entre ellas (Bertram et al., 2002; Chen y Powers, 2006; Conrad et al., 2014; Nicastro et al., 2015; Zhang et al., 2011), ya sea porque comparten ciertos componentes o porque una ruta afecta de forma indirecta a otra. La señalización de nutrientes influye en otros procesos, como la represión catabólica de nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*) o por fuente de carbono y en eventos de comunicación entre orgánulos, como la respuesta retrógrada, en las que convergen estímulos adicionales a la disponibilidad de nutrientes.

### 6.1. Señalización por fuente de carbono

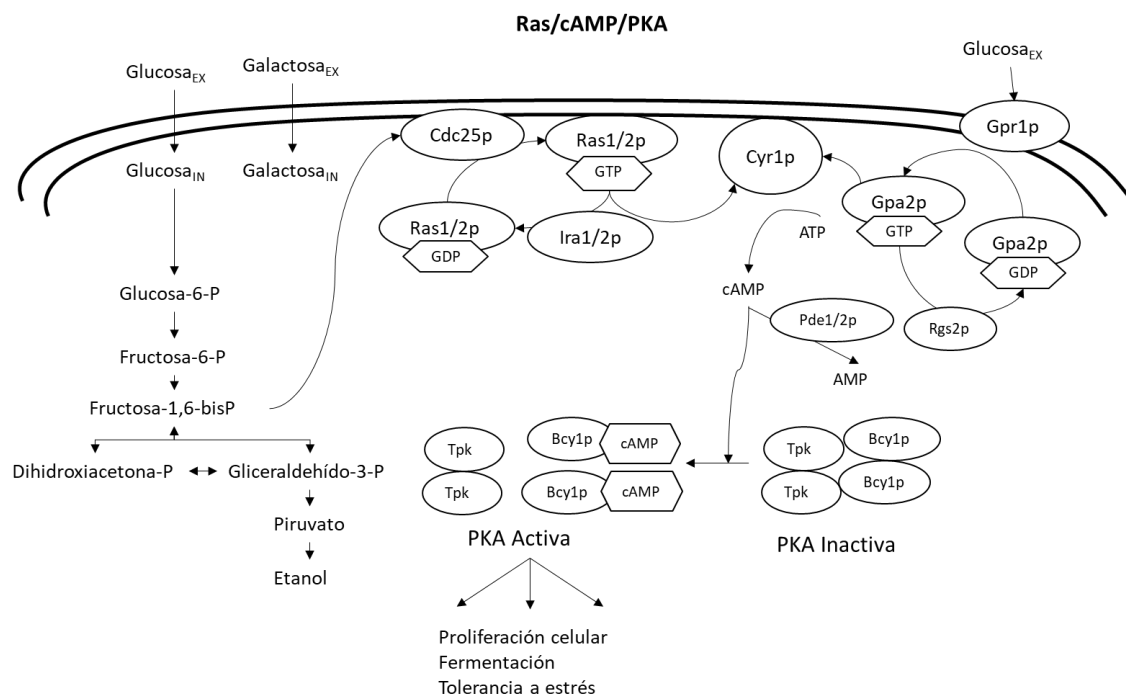
*S. cerevisiae* se caracteriza por fermentar preferentemente la glucosa y la fructosa frente a otros hidratos de carbono fermentables, como la sacarosa o la galactosa, y frente al uso de otras fuentes de carbono no fermentables cuyo consumo requiere la activación del metabolismo respiratorio, como el etanol y el glicerol. La preferencia de metabolizar fermentativamente la glucosa, incluso en condiciones aeróbicas, se conoce como efecto Crabtree. Esta especialización metabólica de *S. cerevisiae* conlleva un mecanismo dual: la detección de glucosa y la detección de otras fuentes de carbono, junto con los mecanismos de señalización intracelular correspondientes. En presencia de glucosa deben activarse los

mecanismos necesarios para la captación y el uso de glucosa y reprimirse los correspondientes mecanismos para otras fuentes de carbono, mientras que en ausencia de la misma deben desreprimirse estos últimos para permitir el uso de fuentes de carbono fermentables alternativas y, en ausencia de éstas, de fuentes no fermentables. Así, la respuesta a la fuente de carbono se produce principalmente a través de dos rutas de señalización: la ruta Ras/cAMP/PKA, que responde principalmente a la disponibilidad de glucosa, y la ruta SNF1, que responde al tipo de fuente de carbono presente en el medio.

### 6.1.1. Ruta Ras/cAMP/PKA

La ruta Ras/cAMP/PKA (Figura 3) es la principal vía de señalización de fuente de carbono, respondiendo fundamentalmente a la disponibilidad de glucosa, para reprimir los mecanismos de respuesta a estrés y estimular el metabolismo y la proliferación celular (Thevelein et al., 2000).

La proteína quinasa A (PKA) es una serina/treonina proteína quinasa conservada en todos los eucariotas. En su estado inactivo es un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas, para las que existen tres posibles genes codificantes (*TPK1*, *TPK2* y *TPK3*), y dos subunidades reguladoras iguales codificadas por el gen *BCY1*. Su activación depende de cAMP, que se une a las subunidades reguladoras de la proteína Bcy1p y alivia su efecto inhibitorio liberando a las subunidades catalíticas para que lleven a cabo sus funciones. Las subunidades catalíticas, aunque son redundantes, presentan funciones específicas diferentes (Robertson y Fink, 1998, Toda et al., 1987b).



**Figura 3.** Ruta de señalización de nutrientes Ras/cAMP/PKA en respuesta a la disponibilidad de glucosa. Modificado de Peeters et al., 2017.

La ruta Ras/cAMP/PKA se basa en un sistema dual de detección de glucosa: la proteína Gpr1p o las proteínas Ras. El primer mecanismo detecta la glucosa extracelular a través de la proteína Gpr1p, un receptor acoplado a proteína G, y su proteína asociada Gpa2p. La unión de GTP a la proteína Gpa2p da lugar a la forma activa del complejo, el cual estimula a la adenilato ciclasa para la producción de cAMP (Kraakman et al., 1999). La hidrólisis de GTP está catalizada

por la proteína Rgs2p (Versele et al., 1999). El segundo mecanismo implica a las proteínas Ras1/2p y parece dispararse debido a señales intracelulares procedentes de la glicólisis. Las proteínas de unión a GTP Ras1p y Ras2p estimulan a la adenilato ciclasa mediante interacción directa cuando presentan GTP unido (Toda et al., 1985). La activación de las proteínas Ras viene determinada por la actividad de las proteínas Cdc25p/Sdc25p mientras que el cambio a GDP y, por tanto, su inactivación, está catalizado por las proteínas Ira1/2p. Independientemente del mecanismo de detección de glucosa, su presencia produce un pico de acumulación de cAMP como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa, codificada por el gen *CYR1*. Los niveles de cAMP vienen determinados por el equilibrio entre la síntesis de cAMP, catalizada por la adenilato ciclasa Cyr1p, y la degradación de cAMP, catalizada por las fosfodiesterasas Pde1p y Pde2p, de alta y baja afinidad respectivamente.

Las dianas de PKA engloban procesos muy diversos, desde enzimas que forman parte de la glicólisis y gluconeogénesis y proteínas implicadas en el metabolismo de disacáridos y polisacáridos, hasta factores de transcripción que regulan la respuesta a estrés y la biogénesis de ribosomas (Busti et al., 2010). Por eso se conoce a PKA como regulador central del estado metabólico y transcripcional de la célula (Zaman et al., 2008).

La activación de PKA en presencia de glucosa promueve el crecimiento y la división celular inhibiendo, de manera dependiente de fosforilación, a las proteínas quinasas Rim15p y Yak1p (Lee et al., 2008) y a sus proteínas efectoras directas Gis1p y Msn2/4p-Hsf1p, respectivamente. La inactivación por fosforilación de los factores de transcripción de respuesta general a estrés Msn2/4p, que inducen la expresión de genes que poseen el elemento STRE (*Stress Response Element*) en su promotor, permite a PKA regular el crecimiento, la acumulación de glucógeno y la respuesta general a estrés (Smith et al., 1998). Igual que otras rutas de señalización por nutrientes, como TOR (Pedruzzi et al., 2003), PKA también regula la entrada en la fase estacionaria mediante la inhibición de la proteína Rim15p, proteína quinasa esencial para la parada del ciclo celular en G1 como consecuencia del ayuno de nutrientes. Por otra parte, PKA controla la biogénesis de ribosomas a través del factor transcripcional Sfp1p, igual que la ruta TOR/Sch9p (Marion et al., 2004). Además del control de la expresión génica y de la síntesis de proteínas, PKA también es capaz de modular directamente la actividad de ciertas enzimas metabólicas implicadas en la glicólisis, como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Peeters et al., 2017), la 6-fosfofructo-2-quinasa (Dihazi et al., 2003) y la piruvato quinasa (Portela et al., 2002).

#### 6.1.2. Snf1p y los mecanismos de represión por catabolito

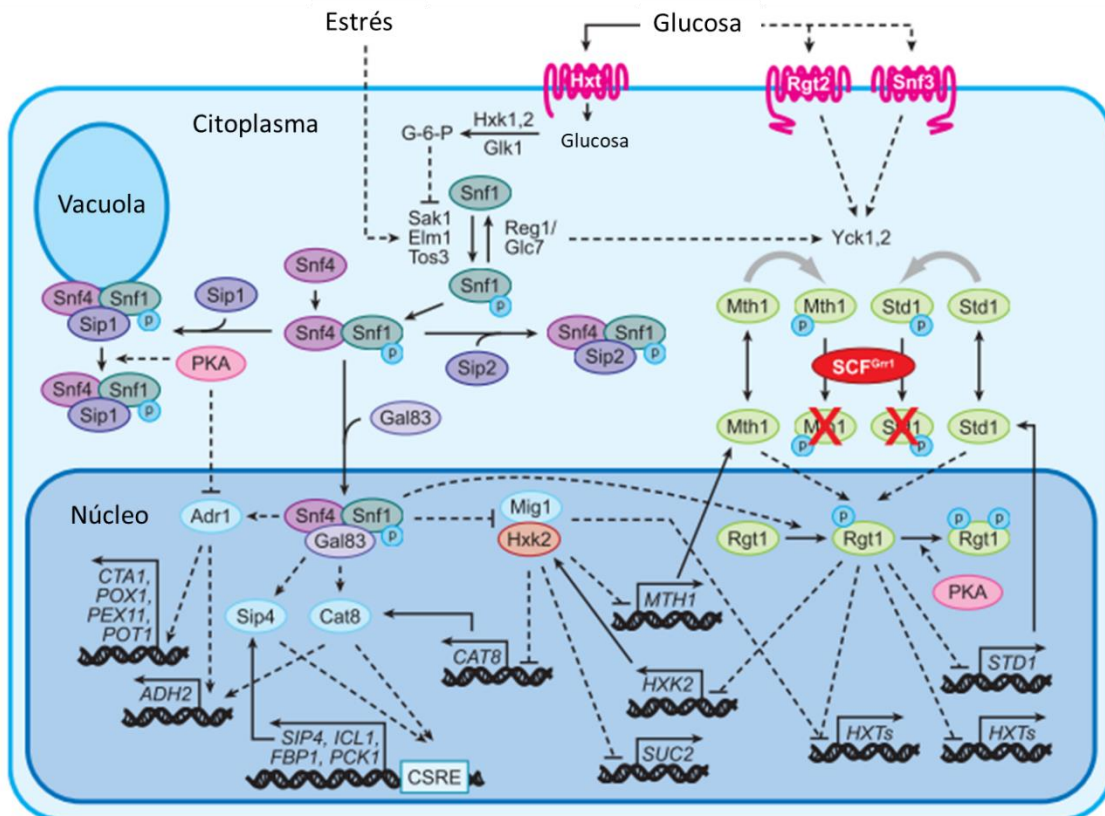
La presencia de glucosa en el medio reprime la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas, la gluconeogénesis, la respiración y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en un proceso conocido como represión catabólica por glucosa (revisado en Busti et al., 2010; Conrad et al., 2014; Santangelo, 2006). Este mecanismo, dependiente en levadura de los represores transcripcionales Mig1p y Adr1p, es controlado por la serina/treonina proteína quinasa Snf1p, ortólogo de la subunidad catalítica  $\alpha$  de AMPK (*AMP-activated protein kinase*) de mamíferos.

Snf1p forma parte de un complejo heterotrimérico integrado, además, por la subunidad reguladora  $\gamma$ , Snf4p, y una de tres posibles subunidades reguladoras  $\beta$  (Sip1p/Sip2p/Gal83p), que determinan la localización subcelular del complejo, Figura 4. A partir de ahora, SNF1 hará referencia al complejo formado por Snf1p-Snf4p-Sip1p/Sip2p/Gal83p. En presencia de glucosa, las tres subunidades  $\beta$  reguladoras se localizan en el citoplasma. Cuando la concentración de glucosa cae por debajo de un umbral, el complejo SNF1-Gal83p se transloca al núcleo donde induce la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis, el ciclo del glioxilato, el



metabolismo respiratorio y el crecimiento filamentosos; el complejo SNF1-Sip1p se transloca a la membrana vacuolar y, por último, el complejo SNF1-Sip2p permanece en el citoplasma (Vincent et al., 2001).

La activación del complejo SNF1 incluye dos pasos: la fosforilación de la proteína Snf1p en su residuo de treonina 210 (Thr210) y la interacción entre las proteínas Snf1p y Snf4p, la cual bloquea la autoinhibición de Snf1p. La fosforilación de la Thr210 está catalizada por tres quinasas de actividad constitutiva, Sak1p, Elm1p y Tos3p, por lo que el estado de fosforilación de la proteína Snf1p depende de la fosfatasa implicada en su defosforilación, Glc7p, y su subunidad reguladora Reg1p.



**Figura 4.** Ruta de señalización de nutrientes SNF1 y ruta retrógrada. Adaptado de Zaman et al., 2008.

El complejo SNF1 regula la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono alternativas, como la sacarosa, la maltosa y la galactosa, que son reprimidos por el represor transcripcional Mig1p. En condiciones de baja concentración de glucosa, SNF1 fosforila directamente a dicho factor transcripcional (Treitel et al., 1998), una de sus principales dianas, provocando su translocación al citoplasma y permitiendo la expresión de genes codificantes de enzimas para la utilización de azúcares fermentables alternativos (*SUC*, *MAL*, *GAL*). Además, el complejo SNF1 también fosforila a la hexoquinasa Hxk2p, evitando su translocación al núcleo donde, en presencia de glucosa, manifiesta una actividad *moonlighting* de represor transcripcional al unirse al represor Mig1p y mantenerlo en el núcleo (Fernández-García et al., 2012; Vega et al., 2016).

El complejo SNF1 también responde al estrés ambiental a través de su factor transcripcional por excelencia, Msn2p. El ayuno de glucosa dispara la defosforilación de Msn2p a través de

Glc7p y, por tanto, su translocación al núcleo donde se une a secuencias STRE en los promotores de genes de respuesta a estrés e induce su expresión. El complejo SNF1 también presenta activadores transcripcionales como dianas directas, siendo los más importantes Cat8p y Sip4p, que se unen a secuencias CSRE (*Carbon Source Response Elements*) para inducir la expresión de genes de respuesta a fuente de carbono. Ambos factores controlan la expresión de genes gluconeogénicos, del ciclo del glioxilato y del metabolismo respiratorio en respuesta al ayuno de glucosa. El metabolismo del etanol y la oxidación de ácidos grasos también resultan inducidos por Snf1p a través del factor transcripcional Adr1p (Ratnakumar et al., 2009; Ratnakumar y Young, 2010). Snf1p también inactiva, bajo condiciones de baja concentración de glucosa, a las fosfatasa Sit4p y Glc7p y, consecuentemente, se produce la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 $\alpha$ . Todo ello reduce la formación de complejos ternarios y una bajada de la traducción general (Cherkasova et al., 2010), como se detallará más adelante. Además, también afecta a genes implicados en el remodelamiento de la cromatina, en concreto, a la acetilación de la histona H3 presente en los promotores de los genes *HXT2/4*, todo ello a través del reclutamiento del complejo SAGA (van Oevelen, 2006).

Mutantes de delección en *IRA1/2* o en la subunidad reguladora Bcy1p de PKA, que presentan activada la ruta Ras/cAMP/PKA, muestran una reducción parcial de la actividad de la ruta SNF1. Por el contrario, mutantes de delección en el gen del receptor de glucosa Gpr1p, que forma parte del sistema dual de detección de Ras/cAMP/PKA, presentan activación de Snf1p. Como consecuencia, siempre se ha considerado que la activación de ambas rutas produce efectos antagónicos. La proteína quinasa Sak1p, encargada de la fosforilación de Snf1p, presenta un motivo de fosforilación por PKA por lo que parece ser una proteína diana de la ruta Ras/cAMP/PKA (Barrett et al., 2012). La interacción entre PKA y Snf1p también se produce a través de la fosforilación del factor transcripcional Rgt1p, que induce la expresión de los transportadores de hexosas (HXT) en respuesta a glucosa (Kim y Johnston, 2006).

Snf1p también responde frente al ayuno de nitrógeno y la inactivación de la ruta TORC1 (Orlova et al., 2006) a través de la quinasa Sak1p (Orlova et al., 2010). Ambas rutas también convergen en el factor transcripcional Gln3p (ver más adelante), tanto TORC1 como SNF1 producen su fosforilación en condiciones de baja concentración de glucosa y en ayuno de nitrógeno (Bertram et al., 2002).

## 6.2. Señalización por Nitrógeno

*S. cerevisiae* puede transportar y utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados, incluyendo aminoácidos, amonio y bases nitrogenadas. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno asimilables dan lugar al mismo crecimiento ni tampoco desatan la misma respuesta celular. De forma generalizada, las principales fuentes de nitrógeno preferidas para la levadura son el amonio, el glutamato y la glutamina mientras que, como no preferidas, se sitúan la prolina y la urea. La preferencia de una fuente de nitrógeno respecto de otra es dependiente de cepa. Las fuentes de nitrógeno preferidas lo son puesto que, una vez internalizadas, pueden usarse directamente en procesos biosintéticos, ser desaminadas para la obtención de amonio o bien utilizarse para la transformación de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato, constituyendo así el cuerpo central del metabolismo del nitrógeno (Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012).

El metabolismo del nitrógeno implica una serie de procesos que engloban desde la detección por el sistema SPS (formado por las proteínas Ssy1p/Ptr3p/Ssy5p), su transporte y su señalización, hasta el catabolismo y el anabolismo de las moléculas nitrogenadas. Las rutas relacionadas son la ruta TOR (*Target Of Rapamycin*), vía la represión catabólica por nitrógeno

(NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*), el control general de aminoácidos (GAAC, *General Amino Acid Control*) y la respuesta retrógrada (RTG).

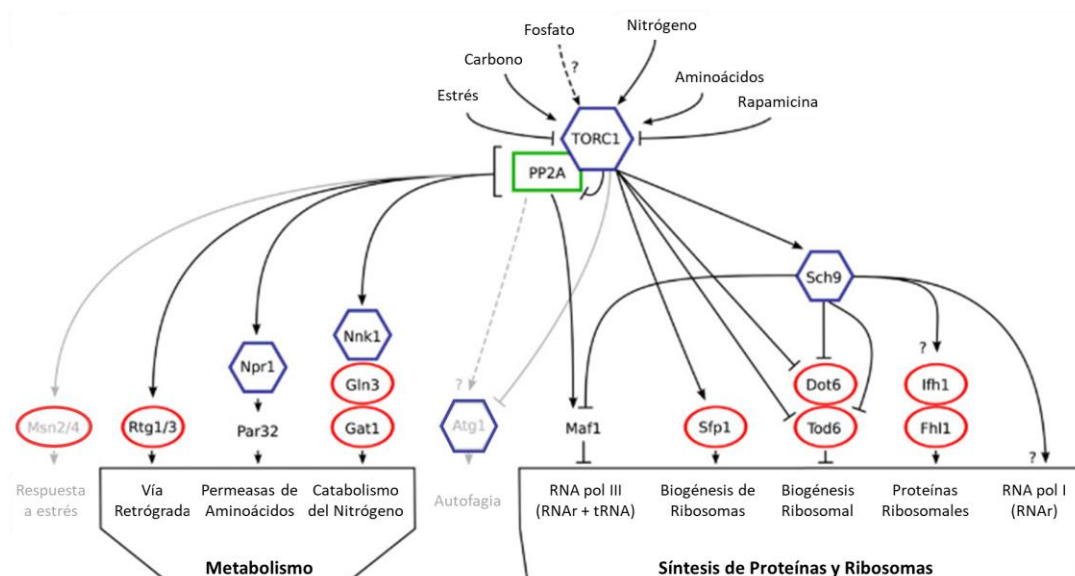
### 6.2.1. Ruta TOR

La ruta TOR (*Target of Rapamycin*), conservada desde levaduras hasta mamíferos, regula y controla los recursos celulares en función de la disponibilidad de nutrientes, principalmente nitrógeno. La inactivación de TOR produce una gran cantidad de cambios metabólicos, transcripcionales y de crecimiento, siendo el más conocido el aumento de la longevidad cronológica.

A diferencia de otros eucariotas, *S. cerevisiae* presenta dos genes codificantes de quinasas TOR, *TOR1* y *TOR2*. Ambos codifican proteínas de gran tamaño (282 kDa) que comparten un 67 % de homología y pertenecen a la familia de las fosfatidilinositol proteína quinasas. Tor1p y Tor2p son las principales proteínas de dos complejos proteicos reguladores conocidos como TORC1 y TORC2. TORC1 está formado por Kog1p, Lst8p, Tco89p y por Tor1p o por Tor2p, mientras que en TORC2 participa exclusivamente Tor2p junto con las proteínas Lst8p, Avo1-3p y Bit6p. Existen diferencias tanto en composición como en función entre los dos complejos de TOR. El complejo TORC1 está implicado en la detección, consumo y metabolismo de nutrientes, en el inicio de la traducción, la biogénesis de ribosomas, la función mitocondrial, la longevidad y la autofagia (Loewith y Hall, 2011; Loewith et al., 2002). En contraposición, el complejo TORC2 regula la síntesis de la pared celular, el citoesqueleto de actina, la endocitosis y la síntesis de esfingolípidos. En resumen, el complejo TORC1 controla temporalmente el crecimiento celular mientras que el complejo TORC2 lo controla espacialmente (revisado en Gonzalez y Rallis, 2017).

Los mecanismos por los cuales TOR regula la síntesis de ribosomas y proteínas y el metabolismo son muy diversos (Figura 5). Ciertos procesos como la síntesis de ribosomas y proteínas están mediados por TORC1 a través de la proteína quinasa Sch9p (Urban et al., 2007), mientras que otros procesos, relacionados con el metabolismo y respuesta a estrés, parecen ser dependientes de las fosfatasa PP2A, Sit4p y Pph21/22p (Beck y Hall, 1999; Boeckstaens et al., 2015; Santhanam et al., 2004). Sch9p es una proteína quinasa de la familia de las proteína quinasas AGC, ortólogo a PKB/Akt de mamíferos. Es el sustrato de fosforilación de TORC1 mejor caracterizado pero no el único. Además, parece que no sólo actúa a través del complejo TORC1 sino también de forma independiente (Smets et al., 2008). Por ejemplo, inhibe la actividad de la proteína quinasa PKA regulando la localización y fosforilación de Bcy1p (Zhang et al., 2011). También está implicada en la biogénesis de ribosomas, el inicio de la traducción, el control del tamaño celular y la división celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. En condiciones de ayuno de nitrógeno, la inhibición de TORC1 produce, a través de la proteinquinasa Sch9p, la detención de la síntesis de ribosomas y proteínas; mientras que la fosfatasa PP2A se activa favoreciendo la síntesis de aminoácidos y asimilación de nitrógeno vía Npr1p, Gln3p, Rtg1/3p y otros factores, así como la respuesta a estrés ambiental a través de Msn2p/Msn4p y la autofagia vía Atg1p.

La distribución de Tor1p entre el citosol y el núcleo parece ser elemento clave para la inducción de la síntesis del rRNA 35S, ya que en condiciones de crecimiento la proteína Tor1p se une al promotor de rDNA 35S (Li et al., 2006). El complejo TORC1 también regula, a través de la proteína quinasa Sch9p, la biogénesis de ribosomas induciendo la activación del activador transcripcional Sfp1p (Marion et al., 2004).



**Figura 5.** Estructura y función de TORC1. Las quinasas se muestran en azul, los factores transcripcionales en rojo y las fosfatasas en verde. Procedente de Hughes Hallett et al., 2014.

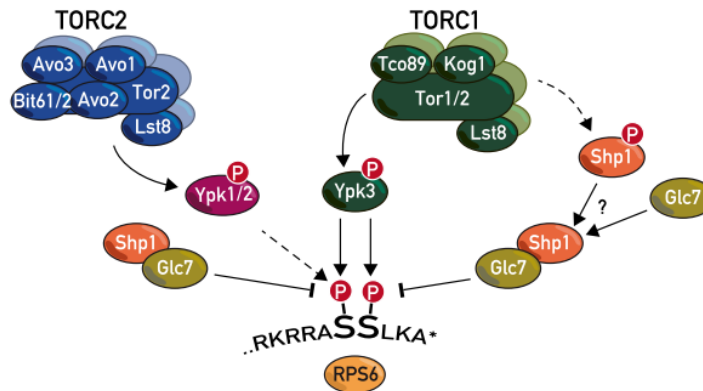
En condiciones de crecimiento, el complejo TORC1 inhibe la actividad de factores transcripcionales implicados en la represión catabólica por nitrógeno (Gat1p, Gln3p), la respuesta retrógrada (Rtg1p, Rtg3p) y la respuesta a estrés (Msn2p, Msn4p) y promueve la biogénesis de ribosomas (Fhl1p, Spf1p). Parte de estos cambios en los factores transcripcionales están mediados por procesos de fosforilación que alteran la localización de dichos factores. Los eventos de defosforilación son llevados a cabo por las fosfatasas Sit4p y Pph21/22p (PP2A, Figura 5). Cuando TORC1 está activo promueve la fosforilación de la proteína Tap42p y, por tanto, su unión a las fosfatasas Sit4p y Pph21/22p inactivando la actividad fosfatasa de dichas enzimas (Busti et al., 2010; Jiang y Broach, 1999).

Como se ha comentado anteriormente, el grueso de la fermentación alcohólica se realiza en estado estacionario, donde las células no se dividen pero están activas metabólicamente. Por ello, la rama del metabolismo regulado por el complejo TORC1 en condiciones de vinificación es de gran importancia ya que permite investigar los cambios que están experimentando las células, Figura 5. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que a día 4 de fermentación en mosto sintético no se detectan polisomas indicando que no hay traducción global activa, por lo que se espera que la rama por debajo de TORC1 controlada por Sch9p se encuentre inhibida.

En ausencia de nitrógeno, TORC1 induce la expresión de permeasas de aminoácidos con el objetivo de aumentar la captación de fuentes de nitrógeno, induciendo la fosforilación de la proteína Par32p (*Phosphorylated After Rapamycin*), Figura 5. Su fosforilación es dependiente del complejo TORC1 a través de la quinasa Npr1p. En presencia de fuente de nitrógeno preferida, TORC1 inhibe a la quinasa Npr1p mediante su defosforilación a través de las fosfatasas Pps1/2p, por lo que Par32p no se fosforila (Boeckstaens et al., 2015; Varlakhanova et al., 2018).

Rps6p, subunidad ribosomal perteneciente a la subunidad 40S y susceptible de fosforilación, es la proteína ribosomal mejor estudiada (Gressner y Wool, 1974). Su fosforilación está conservada desde levaduras hasta mamíferos, existiendo en levaduras dos

sitios conservados en las posiciones Ser232/233, que corresponden a las Ser235/236 en mamíferos. La fosforilación de Rps6p es sensible a nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y a una gran variedad de estreses (Meyuhas, 2008). La proteína Rps6p es fosforilada tanto por TORC1 vía Ypk3p como por TORC2 vía Ypk1p/Ypk2p; y su defosforilación es dependiente de la fosfatasa Glc7p/Schp1p (González et al., 2015; Yerlikaya et al., 2016), Figura 6.



**Figura 6.** Fosforilación de Rps6p de manera dependiente de TORC1 y TORC2. Procedente de Yerlikaya et al., (2016).

La inhibición del complejo TORC1 conlleva una parada en el crecimiento y la división celular, una activación de los mecanismos de protección celular y la acumulación de carbohidratos de reserva (Powers et al., 2006). Toda esa reprogramación celular conduce a un aumento de la longevidad cronológica; de gran importancia puesto que dicha ruta está conservada en mamíferos.

Tanto los genes relacionados con el crecimiento, como por ejemplo enzimas metabólicas principales o proteínas ribosomales, como los relacionados con respuesta a estreses parecen responder a la fuente de carbono y a la de nitrógeno. La fuente de carbono regula la expresión de estos genes a través de la ruta Ras/cAMP/PKA mientras que la fuente de nitrógeno lo hace a través de la ruta TOR/Sch9p (Busti et al., 2010). Sin embargo, ambas rutas comparten numerosas dianas (Maf1p, Fhl1p, Sfp1p, Msn2/4p). La inhibición del complejo TORC1 mediante ayuno de nitrógeno o rapamicina también induce la fosforilación de la proteína Snf1p (Orlova et al., 2006); e incluso comparten algunas proteínas diana como Sch9p, Npr1p o Rtg3p.

### 6.2.2. Represión catabólica por nitrógeno

Las levaduras adaptan su metabolismo y crecimiento en función de la fuente de nitrógeno disponible a través de la represión catabólica por nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*). Este mecanismo permite que, en ausencia de una fuente de nitrógeno preferida, se induzca la expresión de genes necesarios para el uso de otras fuentes de nitrógeno no tan preferidas y viceversa, en presencia de amonio o glutamina, se reprimen los genes que codifican las proteínas necesarias para la captación y el uso de fuentes de nitrógeno pobres. Así pues, la NCR asegura la supervivencia de la levadura en función de la fuente de nitrógeno presente en el medio.

La NCR está regulada principalmente por cuatro factores transcripcionales tipo GATA: dos activadores (Gln3p y Gat1p) y dos represores (Dal80p y Gzf3p). Se caracterizan por un dedo de zinc que permite unirse a secuencias 5'-GATA-3' presentes en los promotores de los genes

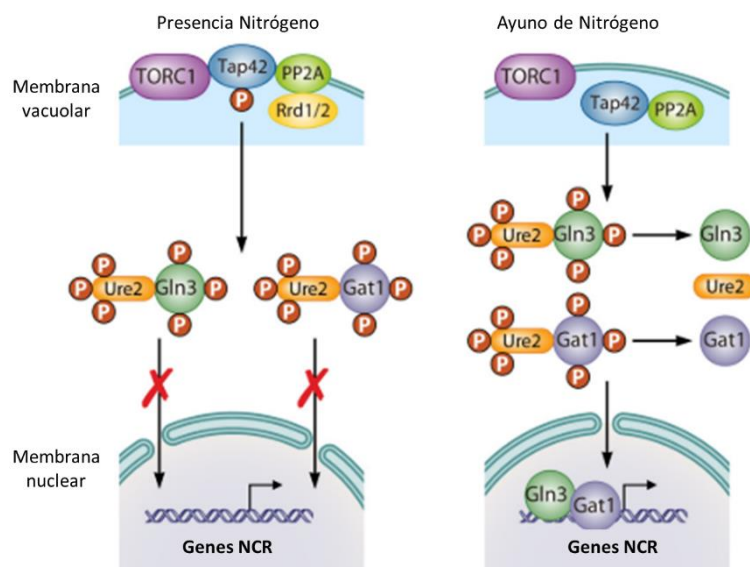
regulados por NCR. La regulación de estos factores de transcripción en función de la fuente de nitrógeno presente en el medio se realiza a través de su localización subcelular; sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a dicha localización todavía no se ha identificado para todos los factores. Los activadores Gat1p y Gln3p inducen la expresión de alrededor de 90 genes implicados en la captación de fuentes de nitrógeno pobres (Scherens et al., 2006). Godard y colaboradores (2007) identificaron nuevos genes diana regulados por NCR, entre los que cabe destacar el activador transcripcional del GAAC Gcn4p, el transportador de péptidos de membrana Ptr2p y el regulador de permeasas de nitrógeno Npr2p, conectando así la NCR con las rutas TORC1 y GAAC.

En presencia de fuentes preferidas de nitrógeno, los activadores transcripcionales GATA (Gln3p y Gat1p) son citoplasmáticos y en su forma fosforilada se encuentran unidos a la proteína represora Ure2p (Blinder et al., 1996; Cunningham et al., 2000), Figura 7. En ayuno de nitrógeno, se produce la defosforilación y la translocación al núcleo donde ambos activadores inducen la expresión de genes NCR (Beck y Hall, 1999). Bertram et al., (2002) demostraron que la fosforilación de Ure2p se produce por acción del complejo Tap42p-Sit4p de manera dependiente del complejo TORC1.

La expresión de Gln3p es constitutiva y no dependiente de NCR (Georis et al., 2009); sin embargo, la expresión de Gat1p es más complicada. La transcripción del gen *GAT1* presenta alternativas tanto en el punto de inicio como en el de terminación, de manera que pueden obtenerse distintas isoformas de Gat1p, con inicio en las metioninas 40, 95 o 102, que no responden a NCR; sin embargo, el transcrito que genera la terminación prematura de Gat1p en la serina 233 está altamente controlado por la fuente de nitrógeno, siendo su abundancia más alta en medios con prolina que con glutamina (Georis et al., 2015; Rai et al., 2014).

Tanto la rapamicina (inhibidor de TORC1) como la metionina sulfoximina (MSX, inhibidor de la glutamina sintetasa) (ver más adelante), producen la translocación de Gln3p al núcleo; sin embargo, sus efectos en la fosforilación de Gln3p son opuestos; mientras que la rapamicina produce la defosforilación, el MSX produce un aumento de la fosforilación (Tate et al., 2009). Todo ello indica que la regulación de la actividad de Gln3p depende del ayuno causado. Gat1p también se transloca al núcleo en presencia de fuentes de nitrógeno no preferidas o en presencia de rapamicina (Kulkarni et al., 2006; Tate et al., 2015), pero dicha translocación parece ser independiente de Ure2p (Georis et al., 2009) y, por tanto, el mecanismo de su translocación parece divergir del de Gln3p. Además, el MSX presenta un efecto opuesto en la localización de las proteínas Gln3p y Gat1p; mientras que MSX induce la translocación de Gln3p al núcleo, no lo hace para Gat1p (Kulkarni et al., 2006). Hasta ahora no se ha demostrado una relación entre el estado de fosforilación de la proteína Gat1p y la fuente de nitrógeno, aunque sí se ha relacionado con fuente de carbono (Kulkarni et al., 2006)

Muchos estudios indican que la forma activa del activador Gln3p es la defosforilada, pues esa es la forma que se localiza en el núcleo y actúa como activador transcripcional para los genes NCR. Sin embargo, Tate et al., (2005) demostraron que la metionina sulfoximina (inhibidor de la glutamina sintetasa) aumentaba la fosforilación de la proteína Gln3p lo que daba lugar a una localización nuclear y una activación de la proteína. Este trabajo sugiere que la actividad y el grado de fosforilación de Gln3p parecen ser independientes.



**Figura 7.** Interconexión entre la ruta TORC1 y NCR a través de los factores transcripcionales Gln3p y Gat1p. Procedente de Zhang et al.,(2018).

### 6.2.3. Control general de aminoácidos

La ausencia de uno o varios aminoácidos en el medio produce la activación del control general de aminoácidos (GAAC, *General Amino Acid Control*) en *S. cerevisiae*, y con ello, una parada global de la traducción mientras que induce, a través del factor transcripcional Gcn4p, la expresión de 57 genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, en la reestructuración de la señalización de fuente de nitrógeno y en la biosíntesis de purinas (Kubota et al., 2003; Magazinnik et al., 2005).

Además de la carencia de aminoácidos, todo cambio en las condiciones de cultivo que produzca niveles elevados de tRNAs descargados y activación de la proteína quinasa Gcn2p, dará lugar a la activación del GAAC, lo que podría explicar que se active en condiciones de ayuno de glucosa, en crecimiento en fuentes de carbono no fermentables como el etanol, frente al estrés salino o en presencia de rapamicina (revisado en Hinnebusch, 2005).

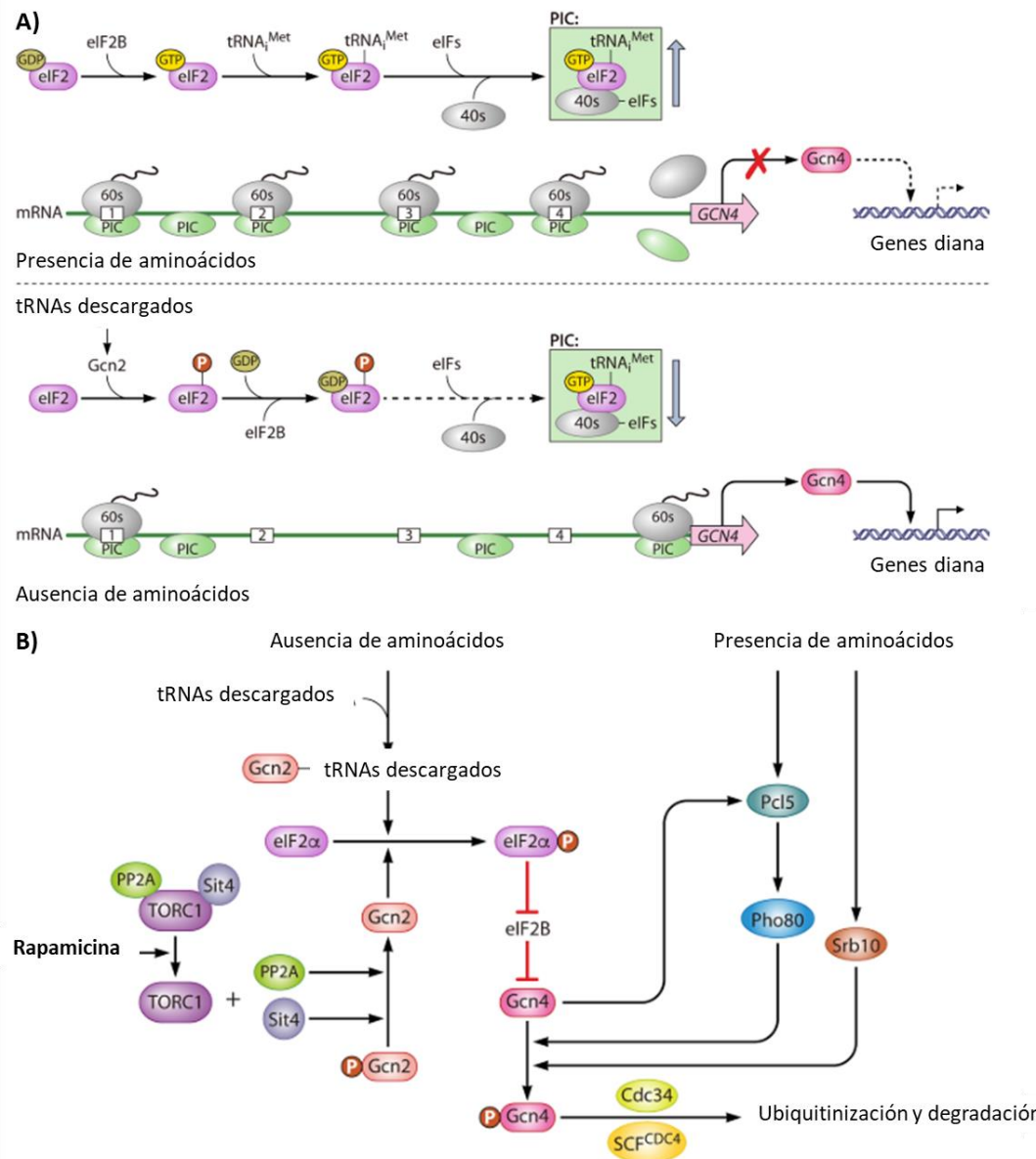
El componente principal de la ruta GAAC es el factor transcripcional Gcn4p, que induce la expresión de genes implicados en las rutas biosintéticas de aminoácidos, en la síntesis de vitaminas, compuestos peroxisomales, proteínas mitocondriales, autofagia y homeostasis del glucógeno (Natarajan et al., 2002). Gcn4p es un activador transcripcional que se une a las secuencias GA(C/G)TCA presente en los promotores de los genes de respuesta a GAAC, induciendo su transcripción. La activación de la proteína quinasa Gcn2p como consecuencia de la acumulación de tRNAs descargados produce la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación eucariótico eIF2 impidiendo que se produzca el intercambio de GDP por GTP mediado por eIF2B (Figura 8). Como consecuencia, disminuye la formación de complejos ternarios formados por tRNA-Met, eIF2 y GTP, y con ello, una parada en la traducción global. Aunque la reducción en los complejos ternarios como consecuencia de la fosforilación de la proteína quinasa Gcn2p conlleva una inhibición general de la traducción, la traducción del factor transcripcional Gcn4p aumenta específicamente (Yang et al., 2000). Ello es debido a la presencia de 4 pautas abiertas de lectura cortas, siendo únicamente la última la que da lugar al transcrito del gen *GCN4*. Cuando la fuente de nitrógeno es óptima, los niveles elevados de complejos ternarios favorecen el inicio de la traducción en la primera pauta de lectura,

disminuyendo así la probabilidad de obtener el mRNA del gen *GCN4*. Sin embargo, en condiciones de ayuno de nitrógeno, los niveles altos de tRNAs descargados producen la fosforilación de la proteína Gcn2p y, por consiguiente, la disminución de los complejos ternarios; esa disminución permite que la subunidad 40S siga hasta la cuarta pauta de lectura y, por tanto, se traduzca Gcn4p.

La actividad de Gcn2p también está regulada directamente por fosforilación dependiente del complejo TORC1. TORC1, a través de la fosfatasa Sit4p-Tap42p, fosforila la Ser577 de Gcn2p disminuyendo así la traducción global pero favoreciendo la traducción de Gcn4p (Cherkasova y Hinnebusch, 2003; Staschke et al., 2010; Valenzuela et al., 2001). La regulación es en ambos sentidos ya que, bajo ayuno de aminoácidos, Gcn2p disminuye la actividad de TORC1 fosforilando directamente a la proteína Kog1p (Yuan et al., 2017). Snf1p también está relacionado con la fosforilación de Gcn2p. En ayuno de glucosa, Snf1p inhibe a las fosfatasa Sit4p y Glc7p encargadas de la defosforilación de eIF2 $\alpha$ , como consecuencia se mantiene su fosforilación incrementando así los niveles de la proteína Gcn4p (Cherkasova et al., 2010). Así, Snf1p actúa de forma contraria a TORC1, bloqueando la traducción y estimulando la síntesis de aminoácidos. Otra de las rutas implicadas en la traducción de Gcn4p es la ruta Ras/cAMP/PKA debido a que la activación de las proteínas Ras aumenta los niveles de Gcn4p (Engelberg et al., 1994).

El GAAC también está implicado en los niveles de nitrógeno en la célula a través del catabolismo de las proteínas para la obtención de aminoácidos a través de la autofagia (revisado en Hinnebusch, 2005; Zhang et al., 2018). Mutantes deficientes en proteínas relacionadas con la autofagia no son capaces de mantener niveles intracelulares adecuados de aminoácidos lo que podría explicar, en parte, la importancia de la autofagia en el reciclado de fuentes de nitrógeno (Onodera y Ohsumi, 2005) y su relación con la ruta TORC1.



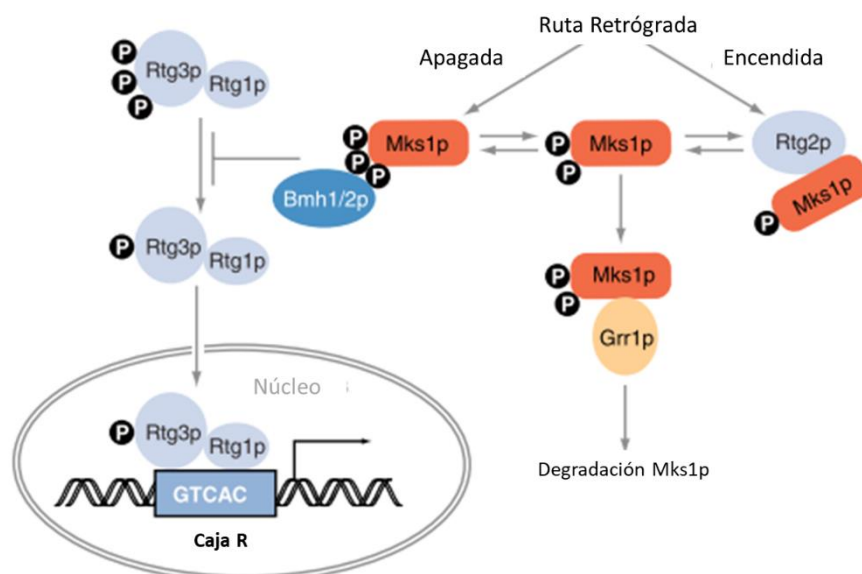


**Figura 8.** Regulación a través de la ruta GAAC. Regulación de la traducción de los genes controlados por la NCR a través del GAAC (A). Regulación de los niveles intracelulares de Gcn4p, incluyendo su conexión con la ruta TORC1 (B). PIC: Complejo preiniciador (*PreInitiation Complex*). Procedente de Zhang et al., (2018).

#### 6.2.4. Respuesta retrógrada

En condiciones de baja concentración de nitrógeno, las levaduras inducen la expresión de genes que codifican enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) con el objetivo de utilizar intermediarios del ciclo como precursores para la obtención de aminoácidos. Sin embargo, la expresión de estas enzimas se ve inhibida por la glucosa, ya que en presencia de ésta la levadura opta por la fermentación y no la respiración oxidativa. Este proceso se regula a través de la ruta retrógrada (RTG, *Retrograde pathway*), que proporciona una vía de asimilación de fuentes de nitrógeno pobres, además de glutamato en ausencia de función mitocondrial y, por tanto, de respiración. También está implicada en la regulación del ciclo del glicoxilato, de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y de la síntesis de lisina (Zaman et al., 2008).

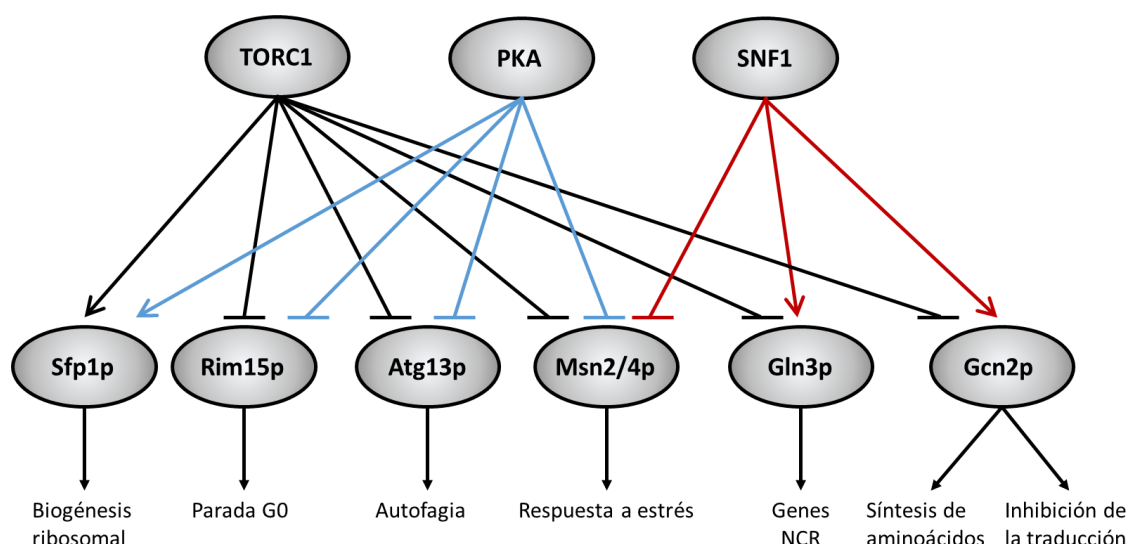
La ruta RTG está formada por cuatro reguladores positivos (Rtg1/2/3p y Grr1p) y cuatro reguladores negativos (Mks1p, Bmh1/2p y Lst8), Figura 9. Cuando la mitocondria está activa y la fuente de nitrógeno es adecuada, los factores transcripcionales Rtg1/3p son citoplasmáticos; por el contrario, cuando se produce una disfunción mitocondrial o un ayuno de nitrógeno, su translocación al núcleo induce la expresión de genes diana. La regulación de la localización núcleo/citoplasma de los componentes Rtg1/3p es muy compleja e implica a las proteínas Mks1p, Rtg2p y Bmh1/2p, principalmente. Rtg1p y Rtg3p forman un activador transcripcional heterotrimérico cuya localización es regulada por otros componentes de la ruta RTG. En condiciones de crecimiento, Mks1p es fosforilado por TORC1 causando su unión a las proteínas Bmh1/2p y reteniendo a Rtg1/3p en el citoplasma. Sin embargo, cuando las condiciones no son favorables, Rtg2p compite con Bmh1/2p por la unión a Mks1p, lo que libera a Rtg1/3p y favorece su translocación al núcleo (Dilova et al., 2002, 2004). A su vez, Mks1p es regulado por la proteína Grr1p, que provoca su ubiquitinización y, por tanto, su degradación. Otro de los reguladores negativos es Lst8p, que forma parte de TORC1 y, por tanto, hace que la RTG sea sensible por otra vía a la regulación por TORC1.



**Figura 9.** Ruta retrógrada de señalización de nutrientes y sus principales efectores. Procedente de Liu y Butow, 2006.

### 6.3. Interacción entre rutas de señalización por nitrógeno y carbono

Aunque cada ruta de señalización de nutrientes responde principalmente a un nutriente específico, es lógico pensar que debe existir una relación entre las diversas rutas para poder así detectar, señalar y responder de manera más precisa y rápida a las condiciones ambientales en las que se encuentra la levadura. De especial importancia es conocer las dianas en las cuales convergen las diferentes rutas de señalización para poder entender mejor el proceso global que permite a las levaduras adaptarse a las condiciones ambientales, Figura 10.



**Figura 10.** Interconexión entre las principales rutas de señalización de nutrientes y sus efectores diana. Los colores de las flechas facilitan la visualización de las relaciones entre las rutas. Las flechas (→) indican activación y las líneas (—|) inhibición. Procedente de Rødkaer y Faergeman, 2014.

Los factores transcripcionales de respuesta general a estrés Msn2/4p resultan reprimidos por las rutas TORC1, PKA y SNF1. Tal y como se ha comentado anteriormente, en presencia de nutrientes estas vías promueven la división y el crecimiento celular; sin embargo, en su ausencia inducen la respuesta a estrés a través de los factores Msn2/4p (Beck y Hall, 1999; Santhanam et al., 2004). Otro de los ejemplos es la regulación del factor transcripcional Gln3p. Según Bertram et al., (2002), las rutas TORC1 y SNF1 convergen en Gln3p. Tanto la inhibición de TORC1 como Snf1p inducen la translocación de la proteína Gln3p al núcleo donde se inducen genes dependientes de NCR; sin embargo, los mecanismos de translocación difieren. La fosforilación de Gln3p mediada por TORC1 reprime la translocación al núcleo mientras que la fosforilación por parte de Snf1p la induce. El activador transcripcional Gat1p también es fosforilado de manera dependiente de Snf1p en condiciones de limitación de glucosa (Kulkarni et al., 2006). La proteína quinasa Rim15p está implicada en la proliferación celular en respuesta a nutrientes, en concreto, en la entrada en la fase estacionaria. Tanto Sch9p como PKA inhiben la fosforilación de Rim15p, evitando así la entrada en fase estacionaria (Roosen et al., 2005). Además, la convergencia en la proteína Rim15p parece influir en la disyuntiva entre crecimiento fermentativo y respiratorio (Olivares-Marin et al., 2018). La proteína Sfp1p es responsable de la expresión de proteínas ribosomales que también se encuentra regulada positivamente por la ruta TORC1 y PKA (Marion et al., 2004), como se ha comentado anteriormente. En condiciones de crecimiento adecuadas, la proteína Sfp1p se mantiene en el núcleo, donde induce la transcripción de genes ribosomales; en condiciones desfavorables para el crecimiento, tanto PKA como TORC1, de manera independiente, favorecen la salida de Sfp1p del núcleo, inhibiendo así la expresión de dichos genes.

Dado que la mayor parte de los estudios de señalización de nutrientes en *S. cerevisiae* se han realizado por ser un organismo modelo de eucariotas superiores, siempre se han utilizado cepas de laboratorio. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que las cepas vínicas difieren fisiológica y molecularmente de las cepas de laboratorio (Borneman et al., 2008; Jiménez-Martí et al., 2011; Pizarro et al., 2008). Las cepas vínicas se han aislado del medio

ambiente por su capacidad fermentativa frente a condiciones ambientales adversas; mientras que el objetivo del uso de cepas de laboratorio es obtener un crecimiento rápido y constante en medios ricos. Por todo ello, es importante el estudio de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas y en condiciones de vinificación para discernir qué ramas son relevantes en estas condiciones y qué características son las más beneficiosas para su aplicación industrial.

#### 6.4. Inhibidores químicos de las rutas de señalización por nutrientes

El uso de inhibidores químicos de las rutas de señalización de nutrientes es una herramienta muy útil para estudiar la función global de determinadas rutas metabólicas a través de los cambios metabólicos, genéticos o celulares que causan. Además, evita el uso de mutantes de delección en proteínas diana clave cuyo fenotipo en numerosas ocasiones no puede analizarse debido a la letalidad, baja viabilidad, poco crecimiento o efectos pleiotrópicos.

La rapamicina es un macrólido antifúngico e inmunosupresor que, usado en concentraciones milimolares, inhibe directamente al complejo TORC1 pero no a TORC2. La unión de la rapamicina a su proteína de unión, Fpr1p, permite la formación del complejo Fpr1p-Rapamicina que es capaz de unirse a TORC1 produciendo su inhibición (Koser et al., 1993; Lorenz y Heitman, 1995). El complejo Fpr1p-Rapamicina no puede unirse a TORC2 y, como consecuencia, este complejo es insensible a dicho inhibidor (Loewith et al., 2002). Fap1p es una proteína que compite con la proteína Fpr1p por su unión a la rapamicina (Kunz et al., 2000); por lo que un mutante *fap1Δ* es más sensible a rapamicina mientras que el mutante *fpr1Δ* es más resistente. Numerosos trabajos muestran que el fenotipo causado por la rapamicina, aunque similar en ciertos aspectos, como por ejemplo el aumento de la longevidad, difiere del causado por el ayuno de nitrógeno, que causa también la reducción de actividad de TORC1 (Kulkarni et al., 2006; Rai et al., 2015; Tate et al., 2009, 2015). La cafeína también es capaz de inhibir únicamente a TORC1 (Loewith y Hall, 2011; Wanke et al., 2008).

Otro de los inhibidores químicos más utilizados para el estudio de la respuesta al ayuno de nutrientes es la L-metionina sulfoximina, que inhibe específicamente la glutamina sintetasa produciendo un ayuno de glutamina. Crespo et al., (2002) demostraron que el MSX induce la translocación de los factores transcripcionales Gln3p, Rtg1p y Rtg3p al núcleo induciendo la expresión de genes implicados en la captación y uso de otras fuentes de nitrógeno o bien la síntesis de precursores para la obtención de nitrógeno y la respuesta retrógrada. Sin embargo, el ayuno de glutamina producido por MSX no induce la activación de otros factores por debajo como Gat1p o los factores de respuesta general a estrés Msn2p y Msn4p. MSX solo afectaría a parte de los factores transcripcionales regulados por TORC1 indicando que es capaz de diferenciar entre distintas fuentes de nitrógeno.

El sulfometurón metil (SM) es un inhibidor de la acetolactato sintetasa (ALC), implicada en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Análisis transcriptómicos realizados en presencia de SM muestran una represión de genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos, síntesis de nucleótidos y asimilación de azufre junto con una inducción de transportadores de azúcares y genes para la síntesis de ergosterol (Jia et al., 2000), respuesta transcripcional parecida a la producida como consecuencia de la inhibición de TORC1.

También hay inhibidores químicos que permiten evaluar el metabolismo del carbono. Es el caso de la 2-desoxiglucosa (2DG) y la glucosamina (GlcN), análogos no metabolizables de la glucosa que se han utilizado para el estudio de la represión por glucosa, ya que actúan como

señales positivas de la presencia de glucosa, pero no son metabolizables y, por tanto, no sustentan el crecimiento de *S. cerevisiae*. En su presencia, *S. cerevisiae* no puede metabolizar fuentes de carbono alternativas a la glucosa, como el glicerol o la sacarosa, y no se observa crecimiento. Las cepas que son más resistentes a la 2DG o GlcN, es decir, que pueden usar fuentes de carbono alternativas a la glucosa en su presencia, presentan una regulación anómala de la represión por glucosa. Algunos autores proponen que la resistencia a la glucosamina está relacionada con la presencia del prión [GAR<sup>+</sup>] (Brown y Lindquist, 2009).

La 2DG puede ser fosforilada por la hexoquinasa pero no es sustrato de la fosfoglucosa isomerasa, paso limitante en la glicólisis. La acumulación de 2DG fosforilada es tóxica en la célula como consecuencia de las modificaciones inducidas en los transportadores de glucosa y en su degradación (O'Donnell et al., 2015). Como consecuencia, se produce un ayuno celular de ATP, la activación de la autofagia, de la respuesta a proteínas mal plegadas (*UPR*, *Unfolded Protein Response*) y una activación de Snf1p. Un mutante de delección en *SNF1* tiene una elevada sensibilidad a 2DG. La activación de Snf1p, como consecuencia de la adición de 2DG, no induce la fosforilación de su factor de transcripción principal, Mig1p, paso importante en la respuesta frente al ayuno de glucosa (McCartney et al., 2014).

Por otro lado, la presencia de un grupo amino en la GlcN (2-amino-2-desoxiglucosa) impide su fosforilación por la hexoquinasa, por lo que el fenotipo causado difiere del observado para la 2DG. Algunos autores (Flores y Gancedo, 2018) afirman que la sensibilidad a la glucosamina viene determinada por la ausencia de la enzima glucosamina-6-fosfato desaminasa. La expresión de dicha enzima procedente de *Yarrowia lipolytica* en *S. cerevisiae* permite el crecimiento en presencia de glucosamina como única fuente de carbono y nitrógeno.

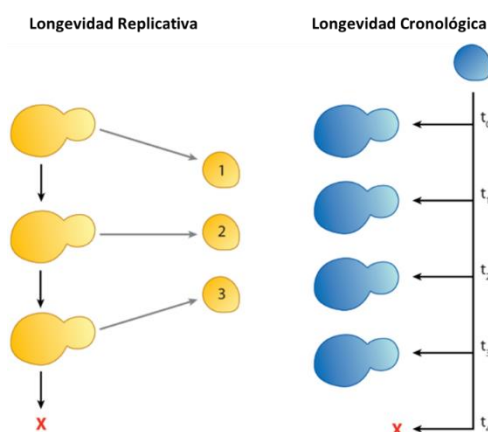
La acción de ciertos compuestos químicos que alteran el metabolismo de las levaduras no es un suceso exclusivo del laboratorio, ya que algunos de ellos son utilizados como herbicidas y fungicidas. Algunos pesticidas, como Folpet®, aunque se degradan en otros compuestos no tóxicos, inhiben por completo la fermentación alcohólica de *S. cerevisiae* y *Kloeckera apiculata* (Cabras et al., 1997). Sin embargo, otros fungicidas, como la quinoxifenina, no tienen efecto en la fermentación alcohólica o maloláctica del vino, incluso a mayores concentraciones de las encontradas en uva (Cabras et al., 2000). Gran parte de los pesticidas y herbicidas utilizados actualmente pueden encontrarse en las uvas (Česnik et al., 2008; Ying y Williams, 1999), por lo que pueden influir en la capacidad fermentativa de la levadura que lleve a cabo la fermentación o incluso inhibir el crecimiento de hongos patógenos de la vid, como es el caso del glufosinato de amonio (GA) (Albrecht y Kortekamp, 2009), cuya diana de acción es la misma que la del compuesto MSX.

## 7. Longevidad

Se entiende como envejecimiento el proceso degenerativo caracterizado por el deterioro progresivo de los componentes y la desregulación de los procesos celulares que culmina con la muerte y que afecta a todos los organismos conocidos (Sutphin y Kaeberlein, 2011). *S. cerevisiae* es un organismo modelo que se ha utilizado tanto para el estudio del envejecimiento como para la longevidad ya que la mayor parte de los mecanismos que los regulan están conservados en mamíferos. Además, como consecuencia de su ciclo celular corto, permite la cuantificación de la longevidad en un tiempo relativamente bajo y con gran facilidad.

Existen dos modelos de longevidad en *S. cerevisiae*: longevidad replicativa (LR) y longevidad cronológica (LC), Figura 11. La LR es el número de células hijas producido por una célula madre antes de su senescencia, mientras que la LC es el tiempo que se mantienen las células viables en fase estacionaria (Fabrizio, 2001; Fabrizio y Longo, 2008; Kaeberlein, 2006; Longo et al., 2012; Orozco et al., 2012b). La LR suele medirse separando la célula hija de la madre mediante un micromanipulador asociado a un microscopio óptico. Todos los métodos utilizados para la determinación de la LC deben realizarse en fase estacionaria, momento en el que algún nutriente se encuentra en escasez. Normalmente, se mantienen las células en estado estacionario durante varias semanas en el medio de cultivo con los nutrientes ya agotados, y se va midiendo la capacidad de las levaduras de formar colonias en placa de medio rico.

Los mecanismos moleculares que determinan la longevidad han sido ampliamente estudiados (revisado en Bitterman et al., 2003; Burtner et al., 2009; Kaeberlein, 2006, 2010; Sutphin y Kaeberlein, 2011) y, aunque cada tipo de longevidad se caracteriza por una respuesta molecular característica, también existe cierto solapamiento (Longo et al., 2012). Por ejemplo, en ambos casos, la restricción dietaria causa un aumento de la longevidad. La restricción dietaria es la disminución del aporte de nutrientes sin inducir malnutrición y su efecto de extensión de la longevidad opera a través de las rutas de señalización de nutrientes. Numerosos estudios han demostrado que el bloqueo de la ruta TOR/Sch9p por delección de sus componentes aumenta la longevidad cronológica (Bonawitz et al., 2007; Powers et al., 2006). Incluso la inhibición de TORC1 mediante inhibidores químicos, como la rapamicina o cafeína, ralentiza el envejecimiento (Kaeberlein et al., 2005; Wanke et al., 2008).



**Figura 11.** Modelos de longevidad para *S. cerevisiae*: longevidad replicativa y longevidad cronológica. Procedente de Steinkraus et al., 2008.

Como consecuencia de la separación asimétrica característica del proceso de división de *S. cerevisiae*, la célula madre retiene la mayor parte del daño asociado al envejecimiento. Los ERCs (*Extrachromosomal Replicative Circles*), moléculas de DNA circulares y autoreplicativas que se retienen asimétricamente en la célula madre, son las moléculas que más influyen en la LR, aunque parece que es la inestabilidad cromosómica lo que causa el envejecimiento. Otros factores que disminuyen la LR son: acumulación de yemas, disminución de la difusión de nutrientes como consecuencia del aumento del tamaño celular, pérdida de la asimetría, mitocondrias y proteínas dañadas (principalmente por el estrés oxidativo) y alteración en la acetilación de histonas (revisado en Bitterman et al., 2003; Sutphin y Kaeberlein, 2011).

Por otra parte, la fase estacionaria se caracteriza por la imposibilidad de entrar de nuevo en el ciclo celular por la ausencia de algún nutriente esencial, generalmente la fuente de carbono, y, por tanto, las células se mantienen activas metabólicamente pero no se dividen. Como consecuencia, los mecanismos moleculares que afectan a la LC están relacionados con la acumulación de metabolitos tóxicos y los cambios inducidos en el medio de crecimiento. En condiciones de metabolismo fermentativo, se produce la acumulación de etanol y otros compuestos secundarios, como el ácido acético, que disminuyen la longevidad como consecuencia de su toxicidad (revisado en Burtner et al., 2009; Fabrizio y Longo, 2008; Kaerberlein, 2006). Aquellas células capaces de almacenar más hidratos de carbono de reserva, como el glucógeno o la trehalosa, presentarán una LC mayor. Durante la fase estacionaria también se induce la autofagia con el objetivo de reutilizar componentes celulares básicos que permitan el metabolismo celular, por lo que el correcto equilibrio en la autofagia y la síntesis proteica garantizarán una mayor supervivencia a lo largo del tiempo.

Respecto a la fermentación alcohólica del vino, la longevidad cronológica es la que tiene mayor impacto. Como se ha comentado anteriormente (apartado 3.1), con la inoculación de LSA, el número de divisiones celulares no es muy grande, mientras que gran parte del consumo de azúcares se produce en fase estacionaria, donde es de gran importancia que las células se mantengan activas metabólicamente, es decir, presenten una longevidad cronológica elevada con el objetivo de que puedan finalizar el consumo de azúcares presentes en el mosto. Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado la implicación de la acetiltransferasa Gcn5p en autofagia, en la longevidad cronológica y en la señalización de TORC1 en condiciones de vinificación (Orozco et al., 2012c), donde el efecto es opuesto al observado en condiciones de laboratorio. Ya se había descrito anteriormente en condiciones de laboratorio la implicación de la proteína Gcn5p en la longevidad replicativa a través de la estabilidad del genoma y la respuesta retrógrada (Kim et al., 2004). Gcn5p es la subunidad catalítica de tres complejos encargados de la modificación de la cromatina (ADA, SAGA y SLIK/SALSA) por lo que interviene en la regulación transcripcional de numerosos genes. La acetiltransferasa Gcn5p no solo está relacionada con la longevidad sino también con las rutas de señalización de nutrientes, ya que Gcn4p, implicado en el control general de aminoácidos, recluta a Gcn5p a promotores específicos para inducir la transcripción de genes dependientes de Gcn4p (Kuo et al., 2000) y con la respuesta retrógrada. También se ha descrito que Snf1p regula la actividad transcripcional de Gcn5p (Liu et al., 2010).

## OBJETIVOS

---





## 1. Objetivos

El objetivo global de la tesis es investigar el papel de las rutas de señalización por disponibilidad de nutrientes en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación vínica en base al conocimiento en condiciones de laboratorio. Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el estado de activación o inactivación de las principales rutas en condiciones de vinificación y analizar la respuesta diferencial frente a ayuno de nitrógeno y de glucosa en cepas vínicas y de laboratorio, tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de vinificación.
- Analizar el efecto de la mutación de genes representativos de las principales rutas de señalización de nutrientes en el comportamiento fenotípico de la levadura durante la vinificación y estudiar la potencial relación de los diversos factores en condiciones de fermentación vínica.
- Obtener cepas mejoradas en la adaptación al ayuno de nutrientes mediante evolución dirigida en presencia de inhibidores de las rutas de señalización por nutrientes o análogos estructurales de nutrientes.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



# 1. Materiales

## 1.1. Cepas de microorganismos

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, tanto vínicas como de laboratorio, utilizadas durante este trabajo se detallan en orden alfabético en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Cepas vínicas\* y de laboratorio de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia
71B	Cepa comercial LALVIN 71B®	Lallemand Inc
BCS103	Cepa comercial <i>SafCeno™ BC S103</i>	Fermentis
BM45	Cepa comercial Lalvin BM45®	Lallemand Inc
BQS252	MAT a <i>ura3-52</i> . Fondo genético FY1679	J. Enrique Pérez-Ortín
<u>BQS252 Gat1-GFP pRS416</u>	BQS252 <i>pRS416 GAT1::GFP-URA3</i>	Este trabajo
BQS252 Gat1-MyC	BQS252 <i>GAT1::MyC-KanMX</i>	“ ”
<u>BQS252 Gln3-GFP pRS416</u>	BQS252 <i>pRS416 GLN3::GFP-URA3</i>	“ ”
BQS252 Gln3-MyC	BQS252 <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>gln3Δ</i>	BQS252 <i>gln3::KanMX</i>	“ ”
BQS252 Par32-MyC	BQS252 <i>PAR32::MyC-KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>ras1Δ</i>	BQS252 <i>ras1::KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>ras2Δ</i>	BQS252 <i>ras2::KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>rgs2Δ</i>	BQS252 <i>rgs2Δ::KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>sdcc25Δ</i>	BQS252 <i>sdcc25::KanMX</i>	“ ”
BQS252 <i>sod1Δ</i>	BQS252 <i>sod1::KanMX</i>	LBLI
BY4742	BY4742 MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
BY4742 <i>fap1Δ</i>	BY4742 <i>fap1::KanMX</i>	Euroscarf
BY4742 <i>fpr1Δ</i>	BY4742 <i>fpr1::KanMX</i>	Euroscarf
BY4742 <i>gat1Δ</i>	BY4742 <i>gat1::KanMX</i>	Este trabajo
BY4742 <i>gat1Δ</i> GAT1-BY4742	BY4742 <i>gat1::LoxP GAT1-BY4742-KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>gat1Δ</i> GAT1-C9	BY4742 <i>gat11::LoxP GAT1-C9-KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>gat1Δ</i> GAT1-EC1118	BY4742 <i>gat1::LoxP GAT1-EC1118-KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>gat1Δ gln3Δ</i>	BY4742 <i>gat1::LoxP gln3::KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>gln3Δ</i>	BY4742 <i>gln3::KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>ras1Δ</i>	BY4742 <i>ras1::KanMX</i>	“ ”
BY4742 <i>ras2Δ</i>	BY4742 <i>ras2::KanMX</i>	“ ”
BY4743	MAT a/α <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
<u>BY4743 Gat1-GFP</u>	BY4743 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
<u>BY4743 Gat1-MyC</u>	BY4743 <i>GAT1::MyC-KanMX</i>	“ ”
BY4743 <i>gat1Δ</i>	BY4743 <i>gat1::loxP</i>	“ ”
<u>BY4743 Gln3-GFP</u>	BY4743 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
<u>BY4743 Gln3-MyC</u>	BY4743 <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
C9	C9 Mat a <i>ho::loxP</i>	Walker et al., 2003

Cepa	Genotipo	Procedencia
<u>C9 <i>adr1</i>Δ</u>	C9 <i>adr1::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>aqy1</i> Δ	C9 <i>aqy1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>aqy2</i> Δ	C9 <i>aqy2::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>atg18</i>Δ</u>	C9 <i>atg18::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>azr1</i>Δ</u>	C9 <i>azr1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>bcy1</i> Δ	C9 <i>bcy1::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>cki1</i>Δ</u>	C9 <i>cki1::KanMX</i>	“ ”
C9 Gat1-GFP	C9 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gat1</i> Δ	C9 <i>gat1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gat1</i> Δ GAT1-BY4742	C9 <i>gat1::LoxP GAT1-EC1118::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gat1</i> Δ GAT1-C9	C9 <i>gat1::LoxP GAT1-C9::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gat1</i> Δ GAT1-EC1118	C9 <i>gat1::LoxP GAT1-C9::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gat1</i> Δ <i>gln3</i> Δ	C9 <i>gat1::LoxP gln3::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gcn2</i> Δ	C9 <i>gcn2::KanMX</i>	LBLI
C9 <i>gcn4</i> Δ	C9 <i>gcn4::KanMX</i>	LBLI
C9 <i>gcn5</i> Δ	C9 <i>gcn5::KanMX</i>	LBLI
C9 Gln3-GFP	C9 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>gln3</i> Δ	C9 <i>gln3::KanMX</i>	“ ”
C9 Gpd1-GFP	C9 <i>GPD1::GFP-KanMX</i>	“ ”
C9 <i>gut2</i> Δ	C9 <i>gut2::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>lhp1</i>Δ</u>	C9 <i>lhp1::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>maf1</i>Δ</u>	C9 <i>maf1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>mks1</i> Δ	C9 <i>mks1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>pde1</i> Δ	C9 <i>pde1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>pde2</i> Δ	C9 <i>pde2::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>pex12</i> Δ	C9 <i>pex12::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>pex12</i> Δ Gpd1-GFP	C9 <i>pex12::loxP GPD1::GFP-KanMX</i>	“ ”
C9 P <sub>MET17</sub> -GCN4	C9 <i>P<sub>MET17</sub>-GCN4::KanMX</i>	LBLI
C9 <i>ras1</i> Δ	C9 <i>ras1::KanMX</i>	Este trabajo
C9 <i>ras2</i> Δ	C9 <i>ras2::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>rgs2</i> Δ	C9 <i>rgs2::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>rgs2</i> ΔCt	C9 Rgs2p truncada en el extremo C-terminal	“ ”
C9 <i>rgt1</i> Δ	C9 <i>rgt1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>sch9</i> Δ	C9 <i>sch9::loxP</i>	LBLI
<u>C9 <i>sch9</i>Δ <i>adr1</i>Δ</u>	C9 <i>sch9::loxP adr1::KanMX</i>	Este trabajo
<u>C9 <i>sch9</i>Δ <i>gcn4</i>Δ</u>	C9 <i>sch9::loxP gcn4::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>sch9</i>Δ Gln3-GFP</u>	C9 <i>sch9::loxP GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
C9 <i>sch9</i> Δ Gpd1-GFP	C9 <i>sch9::loxP GPD1::GFP-KanMX</i>	“ ”
C9 <i>sdc25</i> Δ	C9 <i>sdc25::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>snf1</i> Δ	C9 <i>snf1::KanMX</i>	“ ”
C9 <i>std1</i> Δ	C9 <i>std1::KanMX</i>	“ ”

Cepa	Genotipo	Procedencia
C9 <i>tor1Δ</i>	C9 <i>tor1::KanMX</i>	LBLI
<u>C9 <i>tor1Δ</i> Gln3-GFP</u>	C9 <i>tor1::loxP GLN3-GFP::KanMX</i>	“ ”
<u>C9 <i>ura3Δ</i> Gat1-GFP pRS416</u>	C9 <i>ura3::KanMX pRS416 GAT1::GFP-URA3</i>	Este trabajo
<u>C9 <i>ura3Δ</i> Gln3-GFP pRS416</u>	C9 <i>ura3::KanMX pRS416 GLN3::GFP-URA3</i>	“ ”
C9 <i>ura3Δ</i> Gln3-MyC pRS416	C9 <i>ura3::KanMX pRS416 GLN3::MyC-URA3</i>	“ ”
C9 <i>ypk3Δ</i>	C9 <i>ypk3::KanMX</i>	“ ”
CEN.PK 141-2	MATa <i>ura3</i>	Sergi Puig
CKS102	Cepa comercial <i>SafCeno™ CK S102</i>	Fermentis
CSM	Cepa comercial Enoferm CSM®	Lallemand Inc
<u>CSM Gat1-GFP</u>	CSM <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
<u>CSM Gln3-GFP</u>	CSM <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
<u>CSM Gln3-MyC</u>	CSM <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
CY3079	Cepa comercial Lalvin CY3079®	Lallemand Inc
DV10	Cepa comercial Lalvin DV10®	“ ”
<u>DV10 Gat1-GFP</u>	DV10 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
<u>DV10 Gln3-GFP</u>	DV10 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
<u>DV10 Gln3-MyC</u>	DV10 <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
EC1118	Cepa comercial Lalvin EC1118®	Lallemand Inc
<u>EC1118 Gat1-GFP</u>	EC1118 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
EC1118 Gat1-MyC	EC1118 <i>GAT1::MyC-KanMX</i>	“ ”
EC1118 <i>gat1Δ</i>	EC1118 <i>gat1::KanMX</i>	“ ”
<u>EC1118 Gln3-GFP</u>	EC1118 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
EC1118 Gln3-MyC	EC1118 <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
EC1118 <i>gln3Δ</i>	EC1118 <i>gln3::KanMX</i>	“ ”
EC1118 <i>mks1Δ</i>	EC1118 <i>mks1::KanMX</i>	“ ”
EC1118 Par32-MyC	EC1118 <i>PAR32::MyC-KanMX</i>	“ ”
EC1118in	Colonia aislada de EC1118 para evolución 2DG	“ ”
eEC1118 a8B	Clon monospórico de eEC1118a 200G Tétrada 8 espora b (T8b)	“ ”
eEC1118 b7a	Clon monospórico de eEC1118b 200G Tétrada 7 espora a (T7a)	“ ”
eEC1118a ± 100 Gen	EC1118 a ± 100 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118a ± 150 Gen	EC1118 a ± 150 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118a ± 200 Gen	EC1118 a ± 200 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118a ± 200 Gen col 1	eEC1118a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 1	“ ”
eEC1118a ± 200 Gen col 2	eEC1118a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 2	“ ”
eEC1118a ± 200 Gen col 3	eEC1118a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 3	“ ”
eEC1118a ± 50 Gen	EC1118 a ± 50 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”



Cepa	Genotipo	Procedencia
eEC1118a TXY •	Clon monospórico de eEC1118a tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
eEC1118b ± 100 Gen	EC1118 b ± 100 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118b ± 150 Gen	EC1118 b ± 150 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	Este trabajo
eEC1118b ± 200 Gen	EC1118 b ± 200 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118b ± 200 Gen col 1	eEC1118b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 1	“ ”
eEC1118b ± 200 Gen col 2	eEC1118b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 2	“ ”
eEC1118b ± 200 Gen col 3	eEC1118b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 3	“ ”
eEC1118b ± 50 Gen	EC1118 b ± 50 Generaciones Evolución dirigida 2-desoxiglucosa	“ ”
eEC1118b TXY •	Clon monospórico de eEC1118b tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
eEC1118in TXY •	Clon monospórico de eEC1118in tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
eM2a	Clon monospórico eM2a	“ ”
eM2a ± 100 Gen	M2a ± 100 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2a ± 150 Gen	M2a ± 150 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2a ± 200 Gen	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2a ± 200 Gen col 1	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 1	“ ”
eM2a ± 200 Gen col 2	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 2	“ ”
eM2a ± 200 Gen col 3	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 3	“ ”
eM2a ± 200 Gen col 4	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 4	“ ”
eM2a ± 200 Gen col 5	M2a ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 5	“ ”
eM2a ± 50 Gen	M2a ± 50 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2a TXY •	Clon monospórico eM2a tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
eM2a x FAP1	Híbrido eM2a x BY4742 <i>fap1::KanMX</i>	“ ”
eM2a x FAP1 T4 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2a x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T4 (a/b/c/d)	“ ”
eM2a x FAP1 T9 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2a x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T9 (a/b/c/d)	“ ”
eM2axFPR1	Híbrido eM2a x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i>	“ ”
eM2axFPR1 T3 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2a x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T3 (a/b/c/d)	“ ”
eM2axFPR1 T5 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2a x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T5 (a/b/c/d)	“ ”
eM2b	Clon monospórico eM2b	“ ”

Cepa	Genotipo	Procedencia
eM2b ± 100 Gen	M2b ± 100 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2b ± 150 Gen	M2b ± 150 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2b ± 200 Gen	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2b ± 200 Gen col 1	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 1	“ ”
eM2b ± 200 Gen col 2	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 2	“ ”
eM2b ± 200 Gen col 3	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 3	“ ”
eM2b ± 200 Gen col 4	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 4	“ ”
eM2b ± 200 Gen col 5	M2b ± 200 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina Colonia 5	“ ”
eM2b ± 50 Gen	M2b ± 50 Generaciones Evolución dirigida Rapamicina	“ ”
eM2b TXY •	Clon monospórico eM2b tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
eM2b x FAP1	Híbrido eM2b x BY4742 <i>fap1::KanMX</i>	“ ”
eM2b x FAP1 T2 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2b x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T2 (a/b/c/d)	“ ”
eM2b x FAP1 T6 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2b x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T6 (a/b/c/d)	“ ”
eM2b x FPR1	Híbrido eM2b x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i>	Este trabajo
eM2b x FPR1 T3 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2b x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T3 (a/b/c/d)	“ ”
eM2b x FPR1 T4 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2b x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T4 (a/b/c/d)	“ ”
eM2b x FPR1 T5 (a/b/c/d) +	Clon monospórico eM2b x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T5 (a/b/c/d)	“ ”
IFI1367	<i>Saccharomyces uvarum</i>	IFI
IFI1391	<i>Saccharomyces uvarum</i>	“ ”
<u>JK9</u>	JK9-3da MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4	M. Hall
L2056	Cepa comercial Lalvin Rhône 2056®	Lallemand Inc
L2056 <i>mks1Δ</i>	L2056 <i>mks1::KanMX</i>	Este trabajo
M2	Cepa comercial <i>Enoferm M2</i> ®	Lallemand Inc
<u>M2 Gat1-GFP</u>	M2 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este trabajo
M2 Gat1-MyC	M2 <i>GAT1::MyC-KanMX</i>	“ ”
<u>M2 Gln3-GFP</u>	M2 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”
M2 Gln3-MyC	M2 <i>GLN3::MyC-KanMX</i>	“ ”
M2in	Colonia inicial de M2 para evolución dirigida Rapamicina	“ ”
M2in 3A	Procedente de espora M2in 3A	“ ”
M2in TXY •	Clon monospórico eM2in tétrada X espora Y (TXY)	“ ”
M2in x eM2a	Híbrido M2in x eM2a	“ ”
M2in x eM2a T2 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x eM2a T2 a/b/c/d	“ ”
M2in x eM2a T4 (f/g/h/i) +	Clon monospórico M2in x eM2b T4 f/g/h/i	“ ”

Cepa	Genotipo	Procedencia
M2in x eM2a T5 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x eM2a T5 a/b/c/d	“ ”
M2in x eM2b T10 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x eM2b T10 a/b/c/d	“ ”
M2in x eM2b T3 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x eM2b T3 a/b/c/d	“ ”
M2in x FAP1	Híbrido M2in x BY4742 <i>fap1::KanMX</i>	“ ”
M2in x FAP1 T2 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T2 (a/b/c/d)	“ ”
M2in x FAP1 T6 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x BY4742 <i>fap1::KanMX</i> T6 (a/b/c/d)	“ ”
M2in x FPR1	Híbrido M2in x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i>	“ ”
M2in x FPR1 T3 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T3 (a/b/c/d)	“ ”
M2in x FPR1 T6 (a/b/c/d) +	Clon monospórico M2in x BY4742 <i>fpr1::KanMX</i> T6 (a/b/c/d)	“ ”
M2in x M2b	Híbrido M2in x M2b	“ ”
QA23	Cepa comercial Lalvin QA23®	Lallemand Inc
QA23 n <i>gln3Δ</i>	QA23 haploide <i>trp1::LoxP gln3::KanMX</i>	Este trabajo
RC212	Cepa comercial Lalvin RC212®	Lallemand Inc
Σ1278b		Grenson, 1966
Σ1278 <i>gln3Δ</i>	Σ1278 <i>gln3::KanMX</i>	Este trabajo
Σ1278 <i>ras1Δ</i>	Σ1278 <i>ras1::KanMX</i>	“ ”
Σ1278 <i>ras2Δ</i>	Σ1278 <i>ras2::KanMX</i>	“ ”
Σ1278 <i>rgs2Δ</i>	Σ1278 <i>rgs2Δ::KanMX</i>	“ ”
Σ1278 <i>sdc25Δ</i>	Σ1278 <i>sdc25::KanMX</i>	“ ”
T73	Cepa comercial Lalvin T73®	Lallemand Inc
TB123	TB123 (JK9-3da <i>GLN3::MyC-KanMX</i> )	M. Hall
UCLM S377	Cepa comercial <i>SafCeno™ UCLM S377</i>	Fermentis
UCLMS235	Cepa comercial <i>SafCeno™ UCLM S325</i>	“ ”
<u>UCLMS235 Gat1-GFP</u>	UCLMS235 <i>GAT1::GFP-KanMX</i>	Este Trabajo
<u>UCLMS235 Gln3-GFP</u>	UCLMS235 <i>GLN3::GFP-KanMX</i>	“ ”

- TXY hace referencia al número de tétrada (X) y la letra a la espora analizada (Y) en cada caso.
- + Espora mostrada en las figuras. Se analizaron al menos 6 tétradas de cada una de las cepas señaladas de manera independiente (datos no mostrados).
- Subrayado Cepas construidas que forman parte de los resultados no mostrados.
- LBLI Laboratorio de Biotecnología de Levaduras Industriales.
- \* La información completa sobre las cepas comerciales puede encontrarse en las páginas web de los fabricantes [lallemandwine.com](http://lallemandwine.com) y [fermentis.com](http://fermentis.com).
- IFI Instituto de Fermentaciones Industriales.

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para la replicación de plásmidos fue DH5 $\alpha$  ( $\phi$ 80d, lac ZAM15 endA1 secA1, hsdR17 supE44 thi-1,  $\lambda$ -, gyr A relA1, F-).

### 1.2. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción y uso	Procedencia
pUG6	Plásmido utilizado en la disrupción de genes que contiene el gen marcador de resistencia a genética KanMX4 flanqueado por sitios <i>loxP</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pFA6a-13MyC-KanMX6	Plásmido que contiene 13 repeticiones en tándem de la secuencia que codifica para el epítipo Myc para el etiquetado de proteínas en el extremo C-terminal. Contiene el marcador de resistencia a genética KanMX6	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-GFP(S <sub>65</sub> T)-kanMX6	Plásmido que contiene el gen de la proteína fluorescente GFP para el etiquetado de proteínas en el extremo C-terminal. Contiene el marcador de resistencia a genética KanMX6	Wach <i>et al.</i> , 1997
pYEp351-cre-cyh	Plásmido usado para escindir el marcador de resistencia a genética que presenta el gen de la recombinasa Cre del fago P1 bajo el control del promotor <i>GAL1</i> y marcador de resistencia a cicloheximida	Delneri <i>et al.</i> , 2000
pKanMX-MET17p	Plásmido derivado de pUG6 usado en el reemplazamiento de promotores que contiene el promotor del gen <i>MET17</i>	Orozco <i>et al.</i> , 2012
pRS416-GFP-GAT1	Plásmido centromérico que contiene el gen <i>GAT1</i> , incluido promotor, de la cepa S288c seguido de la proteína fluorescente GFP. Presenta el gen <i>URA3</i> como marcador de selección	Giannattasio <i>et al.</i> , 2005
pRS416-GFP-GLN3	Plásmido centromérico que contiene el gen <i>GLN3</i> incluido promotor, de la cepa S288c seguido de la proteína fluorescente GFP. Presenta el gen <i>URA3</i> como marcador de selección	Giannattasio <i>et al.</i> , 2005
pRS416-MyC-GLN3	Plásmido centromérico que contiene el gen <i>GLN3</i> , incluido promotor, de la cepa S288c seguido de la etiqueta MyC. Presenta el gen <i>URA3</i> como marcador de selección	Wang <i>et al.</i> , 2003

### 1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR se diseñaron mediante el programa Gene Runner (versión 5.0.63 Beta) y se sintetizaron en las casas comerciales Integrated DNA Technologies y Metabion.

Las secuencias de los oligonucleótidos, mostradas en la orientación establecida 5'-3', se recogen en la Tabla 4, donde también se indica el uso específico de cada uno. Habitualmente, los oligonucleótidos nombrados como a y b se utilizaron para amplificar *cassettes* de disrupción mientras que los nombrados como Fw y Rv para *cassettes* de etiquetado. Por otra parte, el oligonucleótido c se diseñó para hibridar en el promotor, el d en la ORF y el e en la 3'-UTR. El diseño de los cebadores se realizó siguiendo las pautas de Longtine *et al.*, (1998).

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
ADR1 a	AAAAAAAAAATATAAAAAAAAAAATCATACTCTATTACTTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
ADR1 b	GAGTACTGGGACGACACATATCAGCAACGAGACATAATCGATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
ADR1 c	GCTACTTTCCCGTTTCTCCC	Comprobación
ADR1 d	GGGGGTTCTACCATTAAAGCC	Comprobación
AQY1 a	GTCAATACGGCACATAAAGTAACATGTAATTAACATAAATTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
AQY1 b	AAGTGCTAGTGAGCGAGAAATAAAGAAAAGGAGGGAAAAAATAGGCCACTA GTGGATCTG	Deleción
AQY1 c	TTAAGCGCAGTGCTTTTCCC	Comprobación
AQY1 d	CATGGTTAGCGACATTGCAG	Comprobación
AQY2 a	AAAATATTCAAAAGCGACACTAGCCTACCTTAGTTATACTTTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
AQY2 b	CAAAGCATTAGTAAAGAGAACCTTGCCTGGAGTCATAGCAATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
AQY2 c	TGTCCATACCGACTATGGC	Comprobación
AQY2 d	GGCTCGGTTGTCAAAGCCAC	Comprobación
ATG18 a	TTCCAGTTAACTCTGTATCCTTTTCTTCTCGGCCTGACTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Deleción
ATG18 b	CGTTGTGACGTACGGAAGGCAGCGCGAGACACTTCCGTGATAGGCCACTAGT GGATCTG	Deleción
ATG18 c	AACTCAGCAGTGGTCATTGC	Comprobación
ATG18 d	AGACATAGCCATAAGGCCAC	Comprobación
AZR1 a	AGTAACACCACGTCTACATTAGTATCTAAATTGCAGCCCATTTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
AZR1 b	AATCAATTCATGAACGGCTTTCTCCACCCATTAAGTTTGATAGGCCACTAGTG GATCTG	Deleción
AZR1 c	CCGCCAACTAGCGGATATCC	Comprobación
AZR1 d	CAAGGCTGCCAGAAACAGCG	Comprobación
BCY1 a	CAAGCAGATTATTTTCAAAGACAACAGTAAGAATAAACTTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
BCY1 b	AGGAAATTCATGTGGATTTAAGATCGCTTCCCTTTTAAATAGGCCACTAGTGG ATCTG	Deleción
BCY1 c	GCAAGGAGCAAAACGAAGAG	Comprobación
BCY1 d	TTGGGCGTTGAAGTGCATTG	Comprobación
CKI1 a	ATACACACATAGATACGCACGTAATAATTAGAGCAAAAGTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
CKI1 b	TTTATTTCTTGGCCTTTGTTGAAGGAATTCGTATACGTAATAGGCCACTAGTG GATCTG	Deleción
CKI1 c	CAGAATAGAAGCTCTGTGGC	Comprobación
CKI1 d	CAGCTCTCAAATCGTCATCG	Comprobación
CYR1 a	GCGCGTGAGAATAGTACTGTTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción
DELTA12	TCAACAATGGAATCCCAAC	Elementos Delta
DELTA21	CATCTTAACACCGTATATGA	Elementos Delta
GAT1 a	ATATATATAGGTGTGTGCACTCCCGGCCCGGTATTAGCTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
GAT1 b	GACATGGAAAGAAGCGAGTACTTTTTTTTTTTTGGGGGATATAGGCCACTAGT GGATCTG	Deleción
GAT1 c	GCTACCGCTGGTATTAACAG	Comprobación
GAT1 d	TATGTTCACTACCGTGCACC	Comprobación

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
GAT1 Fw	GCTCTAAGCTTCATCCAATTCATCTAGTTTC	Etiquetado
GAT1 Fw UTR	GCTCTCATTTTCGCGGTAATC	Comprobación
GAT1 g	GGAAACGTTCTCCAGCTTTC	Comprobación
GAT1 h	AATAGTTGAAAGGCGCAGGG	Comprobación
GAT1 h EC	GGTGTTGTACTTGCACTTGCACTTGTG	Comprobación
GAT1 i	ATCATTGTTCTGACTCGCGG	Comprobación
GAT1 i S288	GGTGTTGTACTTGCACTTGTG	Comprobación
GAT1 Rv	GTCTGGAATTCGCAATAGATGTTGGGTAC	Etiquetado
GAT1 Rv1 Gen	GAGTACAGGTCCCAGATTTTC	Comprobación
GAT1 Rv2 Gen	CATCGTCATCGTCGTCAAAC	Comprobación
GAT1 Rv3 Gen	GTATTATTGGCGATGCTGGG	Comprobación
GAT1 SEQ FW	GCCTCGCCCTTTGCCAGCGG	Secuenciación
GAT1 SEQ RV	CGAAGGCGGAGTAGCCGAAG	Secuenciación
GAT1 SEQ2 Fw	AGACCTGCTCAACGACATGG	Secuenciación
GAT1 SEQ2 Rv	CAAGCATTGCACAGGGGAAG	Secuenciación
GAT1AR F3	ATATAGGTGTGTGCCACTCC	Clonación
GAT1AR F3	ATATAGGTGTGTGCCACTCC	Clonación
GAT1AR R4	ATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACG ACAATACCTGCGCCTTTCAACTATTC	Clonación
GAT1AR R4	ATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACG ACAATACCTGCGCCTTTCAACTATTC	Clonación
GAT1ARDM-Fw	ACAGCCACCACAATACAGAG	Clonación
GAT1AR-F1	AACAGCACTATGAGTCGCAC	Clonación
GAT1AR-F2	TATTGTCGTTAGAACGCGGC	Clonación
GAT1AR-R1	ATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCGTTCTAACG ACAATAAAATTTGGGAGGGCCATTCC	Clonación
GAT1AR-R2	GCTCTTACTGAGCTTCTAGTGACGTCATATAAGACTCAAATAAAGTAATTGCCT AGGATAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Clonación
GAT1AR-R3	GCTCTTACTGAGCTTCTAGTG	Clonación
GCN2 a	TCAATAATTTCCGTTCCCTTAACAC	Deleción
GCN2 b	TTAACTGATGCGTTATAGCGCCGCACA	Deleción
GCN2 c	TTACATTGTTGGAAAGCCTCG	Comprobación
GCN2 d	GCTGCTTATCCAGCTAGAC	Comprobación
GCN2 e	TAAGAAAGGTGACCTACCCC	Comprobación
GCN4 a	CAATTTGTCTGCTCAAGAAAATAAATTAATAACAAATAAATTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
GCN4 b	GAGAATGAAATAAAAAATATAAAATAAAAGGTAAATGAAAATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
GCN4 c	CCAATTGCTATCATGTACCCG	Comprobación
GCN4 d	TGGTTTGGCAGTAGAAGTGG	Comprobación
GCN4 f	GGCTCGCTGTCTTACCTTTTAAATCTTCTACTTCTGACTTCGTACGCTGCAGG TCGAC	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
GCN4 g	TTGGATTAAAGCAAATAAACTTGGCTGATATTCGGACATTGTATGGATGGGG GTAATAG	Sobreexpresión con <i>MET17</i>
GLN3 a	GAGAGAGCACAGGGCCCCCTTTTCCCCACCAACAAACAATTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
GLN3 b	TTATTAACATAATAAGAATAATGATAATGATAATACGCGGATAGGCCACTAGT GGATCTG	Deleción

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
GLN3 c	ATAATACGCGGATAGGCCAC	Comprobación
GLN3 c Bis	ATGGCAATGCTGAGAGAGTG	Comprobación
GLN3 d	ACTGTCACCAGTTTGTCTCG	Comprobación
GLN3 e	ATGCTCAGGATTGTGGTCAG	Comprobación
GLN3 Fw	AGCAATTGCTGACGAATTGGATTGGTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Etiquetado
GLN3 Rv	TTATTAACATAATAAGAATAATGATAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado
GPD1 Fw	AAGAACCTGCCGGACATGATTGAAGAATTAGATCTACATGAAGATCGGATCC CCGGGTTAATTAA	Etiquetado
GPD1 Rv	CGAAAAAGTGGGGGAAAGTATGATATGTTATCTTTCTCCAATAAATGAATTC GAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado
GPD1e	TATGAGAAATGACATAATGC	Comprobación
GUT2 a	TATTGCCATCACTGCTACAAGACTAAATACGTACTAATATTTCTGACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
GUT2 b	TCCTTGTCACCCCTTAACATCATGATCGATATAGGCCACTAGTGGATCTG	Deleción
GUT2 c	ACCCCGCACGCTAAAAATCG	Comprobación
GUT2 d	TTGAGTCCCCTGGTCGCAGC	Comprobación
IRA2 1	AAATGCTGCGGACAATCCTAG	Deleción
IRA2 2	CTCGCAATACTCACTTGAAAC	Deleción
IRA2 b	AACGTGAAAATGATTTTTGACAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Deleción
K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación
K3	CCTCGACATCATCTGCCC	Comprobación
LHP1 a	TTGGTTCTACTGGAATAAGTAGCATCTGCAAAGAAGTATTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
LHP1 b	CTATGATAATGAGATACGAGAACCAGAAGAAACACAAGAAATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
LHP1 c	GTAATGTGTTGAGCCCAACC	Comprobación
LHP1 d	TACGGTTGAATGTGGCGATG	Comprobación
MAF1 a	ATTACTCAAACGGATTTTTTGCCTAAAGAATCACGACATTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
MAF1 b	AGGTGTAAGACAAGGAAAATTCACAAATTAAGTTTAAAAATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
MAF1 c	CCACGAGTTGCTTGCAATC	Comprobación
MAF1 d	AAATATCGCAACTGCCCCAGC	Comprobación
MET17 a	GGGATATCGAATCCCTTAGCTCTC	Clonación
MET17 b	GGGATATCATTGTATGGATGGGGG	Clonación
MET17 c	CCTTGTCGAATTGAACACGC	Comprobación
MKS1 a	TTCCTAATTATTCTCTAATCCTAATAAATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción
MKS1 b	AGAAGTTTAAATACTGTATCTGATTTAATAGGCCACTAGTGGATCTG	Deleción
MKS1 c	GCAGTAGGGATCTTTAACCC	Comprobación
MKS1 d	TGCTCGACACATTTGGATGC	Comprobación
MKS1 e	TCATCTCATCGCATTTCCGG	Comprobación
PAR32 e	TGGTGGTATCGTTCAACGTG	Comprobación
PAR32 Fw	GAAATCAGGGTTTTTCAGTTCTTTGAAACTATGTTAATCGGATCCCCGGGTT AATTAA	Etiquetado
PAR32 Rv	TATTTTATTAGTTTATTAATTTTGCTGATGAATGTTATTGAATTCGAGCTCGTT TAAAC	Etiquetado
PDE1 a	TTCTTCTTCTCATCCCCTTTTTACCAATATTCCTTTTTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Deleción

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
PDE1 b	TTTTCATCTACGTAGTATTATGTTATTGACGTTGTGTACAATAGGCCACTAGTG GATCTG	Delección
PDE1 c	TGCACTTTTGGTGAGGGTG	Comprobación
PDE1 d	ACTGTGTTCCGTATTCGGTG	Comprobación
PDE1 e	GGACTTATGTTGGGATAGGG	Comprobación
PDE2 a	GATCACTACTACTTAATTGAAGAAAACATAACCTAT TGATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección
PDE2 b	GTTTATACAATGAATGGTACAAGAAATTTTGATATTCTTGATAGGCCACTAGT GGATCTG	Delección
PDE2 c	GTCAGTGTGAGAGATTGGAC	Comprobación
PDE2 d	GAAAAGGCGAACTCTGTCC	Comprobación
PDE2 e	CAATAGCCATAATCAACTGGG	Comprobación
PEX12 a	GGGAAAATAAAGCAAAGGAAAGGAAGGTAGTCGTCAGTGTTCGTACGCTG CAGGTCGAC	Delección
PEX12 b	TATATATTACACAGAATTATTTCTTCACTTCCTCCGTCAATAGGCCACTAGTGG ATCTG	Delección
PEX12 c	TATGATGCCACTGACAAGCC	Comprobación
PEX12 d	GAAACAGGATACGTGGCATG	Comprobación
PEX12 F2	TAAATGGGAAGTTGTGACAGGTATTAGGAAGCTACTAATCCGGATCCCCGGG TTAATTAA	Etiquetado
PEX12 R1	TATATATTACACAGAATTATTTCTTCACTTCCTCCGTGAGAATTCGAGCTCGTT TAAAC	Etiquetado
RAS1 a	GATTGAACAGGTAACAATAATTTCCCTTTTGAACGACTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Delección
RAS1 b	GCAATCAAAACCATGTATATCAAGAGAGCAGGATCATTTATAGGCCACTAGT GGATCTG	Delección
RAS1 c	CCACAATTGACTTCGGTTTGG	Comprobación
RAS1 d	CCAGCAGTATCTAGAATGTCC	Comprobación
RAS1 e	AATTGAGGAAGGGTTTGCCG	Comprobación
RAS2 a	TAACCGTTTTCGAATTGAAAGGAGATATACAGAAAAAAATTCGTACGCTGCA GGTC	Delección
RAS2 b	TTCTTTTCGTCTTAGCGTTTCTACAACTATTTCTTTTAAATAGGCCACTAGTGG ATCTG	Delección
RAS2 c	TTCAAGCGTAACGCAATCCG	Comprobación
RAS2 d	GATTTACCAACACCACCACC	Comprobación
RAS2 e	CTTTACCCGGCAACCATATG	Comprobación
RGS2 a	CCTTTGATACATAAAACGAAGAAAATTCAGCACATGCCAGTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Delección
RGS2 b	TTTCTATCGTTGTTCTACTTAATCAAAGTTCTAATCTTGTATAGGCCACTAGTGG ATCTG	Delección
RGS2 c	CTTCAGGCGTCATTTGTAGC	Comprobación
RGS2 a Ct	TTGTAGCCATTATAACAGCAATGTTCAAAACCGTTTGAAATAATTCGTACGCTG CAGGTCGAC	Delección C-terminal
RGS2 e	AAGAAGACTGTGCCCAATGC	Comprobación
RGT1 a	AAGCTGTACTCTTCTCTCAAACCTATATTTCAAATTTTCGTACGCTGCAGGTC GAC	Delección
RGT1 b	GGAGAACCTGACCTACAGGAGAAGGGAGCATAGTTACCTGATAGGCCACTAG TGGA TCTG	Delección
RGT1 c	TTCGTTGGAAATCGCCTCTC	Comprobación
RGT1 d	TTTACGACACTGATCGCAGG	Comprobación
RGT1 e	AATACCGTGGAAGATGGTGG	Comprobación



Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
SCH9 a	ATACTCGTATAAGCAAGAAATAAAGATACGAATATACAATTTCTGACGCTGCA GGTCGC	Deleción
SCH9 b	AAGGAAAAGAAGAGGAAGGGCAAGAGGAGCGATTGAGAAAATAGGCCACT AGTGGATCTG	Deleción
SCH9 c	CCCACTCTCACATAATCACC	Comprobación
SCH9 d	ATGGGTATCCGTTGTCGTTG	Comprobación
SCH9 e	GCGAAGCGTTTACTTAAGCC	Comprobación
SDC25 a	GAGAGACATATCTAAAAGACATATATAATCTGCCACCAGATTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
SDC25 b	ATTAATCCACCGAGAGAAGGAAATCGAACATACGGCGCCGATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
SDC25 c	GATTTACATGCGGCTGTACC	Comprobación
SDC25 d	GGTTGTAAGCATGGAATCCC	Comprobación
SDC25 e	CAACATTGTGGGATAGCAGC	Comprobación
SNF1 a	TTTGTAAACAAGTTTTGCTACACTCCCTTATTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción
SNF1 b	AAAAAAGGGAACCTCCATATCATTCTTTTATAGGCCACTAGTGGATCTG	Deleción
SNF1 c	TCTTACTGCGCATTCGTGTC	Comprobación
SNF1 d	CTTGGGATTGTTAGCGTCG	Comprobación
SNF1 e	GCCACTAGTAGTACTCATCTC	Comprobación
STD1 a	GTAGGAGGTTTTGCACTACTTAACAGACAAATAAAACGAGTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
STD1 b	ATAGTGGGGTATTTGCTTTTTCGTTGTTGTAAAAATTTAATAGGCCACTAGTG GATCTG	Deleción
STD1 c	TCTTTTAGCGAAGGCTGCTC	Comprobación
STD1 d	CAAGTGTTACTTCTGTGACG	Comprobación
STD1 e	GTTCTTGTTGCTGATCGAG	Comprobación
TOR1 a	AGTGAAACATACATCAACCGGCTAGCAGGTTTGCATTGATTTCTGACGCTGCA GGTCGAC	Deleción
TOR1 b	AAATAGTAAACAAAGCACGAAATGAAAAATGACACCGCAGATAGGCCACTAG TGGATCTG	Deleción
TOR1 c	GGTTCTCGCCATTTTGAAGC	Comprobación
TOR1 d	ACCTACTAGAAGTCAGACCG	Comprobación
TOR1 e	AGATGAGGACCTCAGTAAGG	Comprobación
URA3 a	ACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCTTCGTACGCTGC AGGTC	Deleción
URA3 b	GTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTATAGGCCACTAGTG GAT	Deleción
URA3 c	AGGAAGAACGAAGGAAGGAG	Comprobación
URA3 d	TCCTTGGTGGTACGAACATC	Comprobación
URA3 e	TCATTACGACCGAGATCCCC	Comprobación
URE2 a	AGTCATATTGTTTTAAGCTGCAAATTAAGTTGTACACCATTTCGTACGCTGCAGG TCGAC	Deleción
URE2 b	TTTCCTTCTTCTTCTTCTTCTGTTTTAAAGCAGCCTATAGGCCACTAGTGGATC TG	Deleción
URE2 c	GAAAGCTTCCTTACTCGAGG	Comprobación
URE2 d	ATTTTGGCTACCATTCGCGC	Comprobación
URE2 e	TTGGAATTCTGTGTTGGGG	Comprobación
YPK3 a	TCAACCAATCTAGCTGAGCATACTGTTGGCAGTAATTAGTTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Deleción
YPK3 b	CAGATCCGAGCCTTCTCTTAATCTATCTAACTTTTAAATAGGCCACTAGTGG ATCTG	Deleción

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Uso
YPK3 c	GGAAGGTGCCCTATGATAAG	Comprobación
YPK3 d	CGGGCTTAAAATCGTGCAGG	Comprobación

## 2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### 2.1. Bacterias

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron en medio LB (Luria Bertani) cuya composición es NaCl 1 % (p/v), triptona 1 % (p/v) y extracto de levadura 0.5 % (p/v). Para la selección de colonias transformadas con plásmido, el medio se suplementó con ampicilina a 50 µg/mL. Los cultivos en placa se obtuvieron añadiendo agar bacteriológico al 2 % (p/v). Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm. Cuando se requirió en un medio selectivo, se añadió ampicilina (50 µg/mL).

### 2.2. Levaduras

#### 2.2.1. Crecimiento en condiciones de laboratorio

Los medios y las condiciones de cultivo utilizados para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se especifican en Adams *et al.*, (1997). Para la propagación habitual, las levaduras se cultivaron a 30 °C en una estufa (medios sólidos) o en un agitador orbital a 200 rpm (medios líquidos, 1/5 del volumen total del matraz). Para la obtención de medios sólidos se añadió agar al 2 % (p/v).

El medio rico YP contiene extracto de levadura 1 % (p/v), peptona bacteriológica 2 % (p/v) y una fuente de carbono al 2 % (p/v). Las fuentes de carbono más utilizadas son glucosa (YPD), galactosa (YPGal), glicerol (YPGli) y sacarosa (YPSac).

El medio mínimo completo (SC) contiene base nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio 0.17 % (p/v) (*Yeast Nitrogen Base without aminoacids and ammonium sulfate*), glucosa 2 % (p/v), sulfato de amonio 0.5 % (p/v) y 0.2 % (p/v) de *drop out*, conteniendo una mezcla de los veinte aminoácidos. La composición del *drop out* se describe en Adams *et al.*, (1997). El medio mínimo (SD) es igual que el SC pero sin *drop out*. Las auxotrofías se han suplementado añadiendo los aminoácidos correspondientes a una concentración final de 20 mg/L para histidina, metionina y triptófano y 100 mg/L para leucina, o uracilo a 20 mg/L.

La selección de transformantes con el marcador de selección Kan<sup>R</sup> se ha realizado suplementando el medio correspondiente con geneticina a 200 mg/L y de los que presentan el marcador cicloheximida con cicloheximida a 2 mg/L.

##### 2.2.1.1. Crecimiento en placas multipocillo

En general, las curvas de crecimiento se han obtenido realizando un seguimiento de la D.O.<sub>600</sub> en el lector de microplacas Varioskan LUX de *ThermoFisher*. Para ello, se han inoculado 200 µL del medio a analizar a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1 a partir de un precultivo de toda la noche en YPD. El seguimiento de la D.O.<sub>600</sub> se ha realizado durante 24 h realizando medidas cada 20 min con incubación a 30 °C y una agitación suave a 180 rpm. Los datos obtenidos se han analizado mediante el programa informático *GrowthRates* (Hall *et al.*, 2013). Los experimentos se han realizado por triplicado.

### 2.2.2. Crecimiento para estudio de envejecimiento cronológico

Los estudios de envejecimiento cronológico se realizaron según lo descrito en Fabrizio y Longo (2007). Se inocularon 30 mL de medio SC en matraces de 100 mL a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1 con células procedentes de un precultivo en medio YPD cultivadas hasta saturación durante 24 h. Las cinéticas de envejecimiento se realizaron en un agitador orbital a 200 rpm a 30 °C. Al cabo de tres días, tiempo en el que se considera 100 % de viabilidad (t<sub>0</sub>), se inició su siembra cada 2 días en placas de YPD con su correspondiente dilución en agua.

El seguimiento de la viabilidad se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonia (u.f.c.) en placa de YPD posterior a la correspondiente dilución en agua. Se representó la supervivencia en escala logarítmica en función del tiempo de vinificación. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 2.2.3. Crecimiento en condiciones de microvinificación

Las vinificaciones se han realizado en dos tipos de mosto: mosto natural y mosto sintético.

El mosto natural fue tinto de la variedad Bobal de la cosecha del 2015, cedido por bodegas Murviedro, suplementado con 10 g/hL de metabisulfito potásico y parcialmente clarificado por sedimentación durante 1-2 días a 10 °C. El mosto fue congelado a -20 °C inmediatamente después de su recepción hasta el día de su utilización. Con el objetivo de evitar contaminación del mosto una vez descongelado, se añadió dimetil dicarbonato (DMDC) 500 µg/L y se dejó actuar durante 24 h en frío. Antes de la inoculación de las levaduras se sembraron 5/50/100 µL de mosto en diversas placas de YPD para comprobar que el mosto estaba completamente desinfectado.

El mosto sintético MS300 se preparó de acuerdo al protocolo diseñado por Riou *et al.*, (1997), con las modificaciones respecto a los ácidos orgánicos introducidas por Viana *et al.*, (2014). Contiene glucosa 100 g/L, fructosa 100 g/L, ácido málico 3 g/L, ácido tartárico 3 g/L, ácido cítrico 0.3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.155 g/L y NaCl 0.2 g/L. Como fuente de nitrógeno se añade NH<sub>4</sub>Cl 0.46 g/L y una solución de aminoácidos. Aquellas vinificaciones realizadas con cepas de laboratorio que presentan auxotrofia para el uracilo se realizaron en mosto sintético suplementado con uracilo a 20 mg/L. Para la obtención de MS60, MS68 y MS75, las fuentes de nitrógeno se han reducido de manera proporcional manteniendo la relación entre amonio y aminoácidos. El mosto también contiene oligoelementos 1 mL/L (compuesto por MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 4 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 g/L, KI 1 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 g/L y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 1 g/L). Además, también se le añadió cloruro de hierro (II) 32 mg/L (Henschke y Jiranek, 1993), que no se indicaba en la receta original. El mosto se completó con vitaminas 10 mL/L (Henschke y Jiranek, 1993) (solución formada por mioinositol 2 g/L, pantotenato de calcio 0.15 g/L, hidrócloruro de tiamina 0.025 g/L, ácido nicotínico 0.2 g/L, piridoxina 0.025 g/L y biotina 0.3 mg/L) y factores anaerobios 1 mL/L (ergosterol 1.5 mL/100 mL y ácido oleico 0.5 mL/100mL, todo ello disuelto en etanol puro y Tween-80 (1:1)). El pH se ajustó a 3.3 con NaOH y posteriormente se procedió a su autoclavado.

Independientemente del tipo de mosto utilizado, los experimentos se realizaron a partir de precultivos en YPD líquido procedentes de colonias aisladas y cultivados durante 48 h en un agitador rotativo a 200 rpm. Ambos mostos se inocularon a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1. Las vinificaciones se llevaron a cabo a 24 °C en agitación suave (50 rpm) en tubos cónicos de centrifuga desechables de 30 o 50 mL, dependiendo del volumen requerido para cada experimento. El crecimiento se siguió mediante el recuento de células viables en placas de YPD

aproximadamente cada 2-3 días mediante la correspondiente dilución en agua y el progreso de la fermentación mediante el consumo de azúcares reductores. Durante la vinificación, se toma como punto de referencia para la viabilidad ( $t_0$ ) aquel tiempo en el que el recuento de u.f.c./mL es máximo y se le adjudica el 100 % de viabilidad. La supervivencia se representa en escala logarítmica a partir del tiempo de referencia.

#### 2.2.3.1. Fermentaciones a pequeña escala para análisis fenómico

Este protocolo se realizó durante la estancia en el laboratorio del Dr. Philippe Marullo, en el Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino en Burdeos (ISVV, *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin*) y se basa en una metodología de fermentación a pequeña escala descrita en Peltier *et al.*, (2018). El mosto utilizado en este caso fue Sauvignon Blanc 2016 proporcionado por Vignobles Ducourt (Ladaux, Francia). Las características del mosto analizadas por laboratorios Sarco® se muestran en la Tabla 5, a excepción del ácido málico que se determinó mediante ensayo enzimático con el kit K-LMAL-116A de Megazyme®.

**Tabla 5.** Características principales del mosto Sauvignon Blanc 2016.

<b>Sauvignon Blanc 2016</b>	
Año de vendimia	2016
Azúcares reductores	205 g/L
Acidez total	4.25 ± 6 % g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	6.50 ± 6 % g/L Ac. tartárico
pH	3.27 ± 2 %
Ácido L-málico	4.13 ± 11 % g/L
Nitrógeno $\alpha$ -aminoácidos	80 ± 7 % mg/L
Nitrógeno amoniacal	19 ± 11 % mg/L
Nitrógeno asimilable	99 ± 18 % mg/L

El mosto se almacenó a -20 °C hasta su uso. El mosto fue suplementado con fuente de nitrógeno hasta obtener una concentración de 250 mg/L de YAN. Como fuente de nitrógeno se añadió NH<sub>4</sub>Cl 80 mg/L y un stock de  $\alpha$ -aminoácidos (170 mg/L) (Riou *et al.*, 1997). Antes de iniciar la fermentación, la esterilización del mosto se llevó a cabo mediante filtración en una membrana de acetato de celulosa 0.45  $\mu$ m (*Sartorius Stedim Biotech*). La fermentación se llevó a cabo en viales de 20 mL (Interchim®) con un volumen de mosto de 11.5 mL. Los viales se cerraron adecuadamente con tapones de rosca de Fisherbrand™ (tapón de rosca universal magnético de 18 mm con orificio central, rosca de precisión y septum). Para favorecer la salida del CO<sub>2</sub> durante la fermentación, se insertaron agujas hipodérmicas (G26-0.45x13 mm de Terumo) en el septum del tapón de los viales. Debido a que se analizaron cepas cuyo crecimiento es muy bajo, se optó por inocular 4·10<sup>5</sup> células viables/mL, procedentes de un precultivo en YPD de 24 h en placas multipocillo profundas (Fisher Scientific). La concentración de células viables se determinó por citometría de flujo (Beckman Coulter) siguiendo el método descrito en Zimmer *et al.*, (Zimmer *et al.*, 2014).

La fermentación, independientemente de si se realizó en agitación o no, se llevó a cabo a 24 °C en un incubador (Binder GmbH). Los viales requeridos se agitaron a 175 rpm durante toda la fermentación en un agitador orbital (SSL1, Stuart Vernon). La fermentación se siguió

por pérdida de peso como consecuencia de la pérdida de CO<sub>2</sub> utilizando una balanza de precisión (AB104, Mettler Toledo). Dicha información fue utilizada para calcular los parámetros cinéticos.

El CO<sub>2</sub> teórico máximo liberado, CO<sub>2</sub>max, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CO_2max = 0.482[azúcar]$$

Donde [azúcar] es la concentración de azúcar en g/L del mosto (Da Silva et al., 2015). Se utilizó una regresión local polinomial para conocer la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado en función del tiempo con la función R-loess estableciendo el parámetro *span* a 0.45. De cada uno de los viales, se determinaron 6 parámetros cinéticos:

- *l<sub>p</sub>* (h): tiempo de fase de latencia hasta liberar los primeros 2 g/L de CO<sub>2</sub>
- *t*<sub>35</sub>/*t*<sub>50</sub>/*t*<sub>80</sub> - *l<sub>p</sub>* (h): tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta *l<sub>p</sub>*
- *v*<sub>50\_80</sub> (g/L-h): velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max
- CO<sub>2</sub>max (g/L): máxima cantidad teórica liberada de CO<sub>2</sub>

Al finalizar la fermentación, se guardaron 800 µL del sobrenadante a -20 °C con el objetivo de analizar los principales parámetros enológicos en la plataforma metabolómica de la Universidad de Burdeos (<https://metabolome.cgfb.u-bordeaux.fr/>) mediante ensayos enzimáticos semiautomatizados. Se midió el ácido acético, glicerol, ácido málico, piruvato, SO<sub>2</sub> total, glucosa y fructosa utilizando los kits enzimáticos correspondientes de la empresa Megazyme (K-ACETGK, K-GCROLGK, K-LMAL-116A, K-PYRUV, K-TSULPH, K-FRUGL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.2.4. Condiciones de evolución dirigida

Los dos experimentos de evolución dirigida realizados en este trabajo han seguido el mismo protocolo, pero difieren en los medios e inhibidores utilizados. Se inocularon 25 mL de medio, YPSac con 2-desoxiglucosa a 100 µg/mL para el experimento de evolución dirigida de la cepa EC1118 y SC con rapamicina a 100 nM para el de la cepa M2. Cada dos días se realizó un pase a un medio de cultivo fresco a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1 procedente del cultivo anterior. Se recogieron muestras tanto para guardar en forma de glicerinado como en placas del mismo medio en el que se realizó la evolución dirigida a 50, 100, 150 y 200 generaciones.

#### 2.2.5. Esporulación y manipulación de esporas

Con el fin de obtener derivados de esporulación de las cepas diploides se sembró biomasa de la cepa correspondiente procedente de placas de YPD frescas en placas de medio ACK (1 % acetato potásico, 2 % agar) y se cultivó a 24 °C al menos tres días; el tiempo de esporulación fue dependiente de cepa. Comprobada mediante observación microscópica la aparición de ascosporas en el medio ACK, las esporas se incubaron 1 h a 30 °C en una solución 2 mg/mL de citohelicasa de Sigma. Las esporas se diseccionaron en un micromanipulador Singer MSM Manual (Singer Instrument) en placas de YPD. Los híbridos se obtuvieron mezclando células haploides en YPD agar entre 6 y 8 h a 30 °C, comprobando cada poco tiempo la hibridación entre células de tipo sexual opuesto, en cuyo caso se trasladaron a otra localización de la placa.

#### 2.2.6. Eliminación de priones con cloruro de guanidinio

Para eliminar la presencia de priones en las sucesivas divisiones celulares se optó por realizar un crecimiento en presencia de cloruro de guanidinio (Byrne et al., 2009). Se

inocularon 25 mL de medio SD, el cual contenía 3 M de GdnCl (cloruro de guanidinio). Se dejó crecer 24 h a 30 °C, momento a partir del cual se sembraron las células con las correspondientes diluciones en PBS (NaCl 137 mM, 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM pH 7.3) en medio YPD diluido cuatro veces para obtener colonias individuales.

### 2.2.7. Medida de la resistencia a estrés y sensibilidad a productos químicos

La resistencia a estrés se estudió en diversas condiciones de crecimiento y con múltiples agentes estresantes, que se detallan a continuación.

#### 2.2.7.1. Goteos en placa

En estos casos el agente a estudiar está presente en la placa sobre la cual se realiza el crecimiento. Las cepas y mutantes de interés se inocularon en precultivos de YPD que se cultivaron durante toda la noche. Una vez medida una alícuota de dicho precultivo, se igualó el D.O.<sub>600</sub> a 1 de todas las cepas a analizar. A continuación, se realizaron cinco diluciones seriadas 1:10 iniciando en  $10^{-1}$  y finalizando con  $10^{-5}$ . Se sembraron 3  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones en placas del medio de interés, ya sea rico o mínimo, conteniendo los diferentes agentes químicos utilizados. Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C.

#### 2.2.7.2. Halos de inhibición

Para determinar la resistencia a determinados compuestos se optó por medir el halo de inhibición de crecimiento. Se sembró un césped conteniendo 2 unidades de D.O.<sub>600</sub> en una placa de YPD de la cepa a analizar. Se hizo uso de un disco de 0.5 cm de diámetro de papel de filtro estéril para embeber el agente causante de estrés en el centro de la placa. Tras un día de incubación a 30 °C se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

#### 2.2.7.3. Cultivo líquido

La tolerancia a estrés por etanol, por NaCl y por choque térmico se midió en cultivos líquidos en YPD en la fase adecuada de crecimiento, añadiendo 10 % etanol, 1 M de NaCl y pasando a 46 °C, respectivamente, e incubando 15 min para el etanol o NaCl y 1 h para el estrés térmico. La viabilidad celular se midió diluyendo, sembrando y contando el número de unidades formadores de colonia antes y después de aplicar al agente causante de estrés.

### 2.2.8. Agentes causantes de estrés e inhibidores

#### 2.2.8.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se analizó mediante halo de inhibición de crecimiento en placas de YPD producido por la aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 % (v/v)), diamida 3 M y menadiona 0.5 M.

#### 2.2.8.2. Inhibidores del metabolismo del nitrógeno

El ayuno de nitrógeno se provocó inhibiendo la biosíntesis de aminoácidos seleccionados o promoviendo la inhibición del complejo TORC1. La inhibición del complejo TORC1 se realizó con rapamicina (200 ng/mL) en YPD y/o SD. El ayuno de nitrógeno producido como consecuencia de la inhibición de la glutamina sintetasa se consiguió añadiendo glufosinato de amonio a una concentración variable de 0.5 o 10 mg/L en mosto sintético o L-metionina sulfoximina 100 mM en medio de laboratorio. Otros inhibidores utilizados fueron sulfometurón metil (SM, 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y 3-amino-1, 2, 4-triazol (AT, 10 mM), ambos en medio SD. Las concentraciones de rapamicina y MSX utilizadas para el cultivo en líquido durante periodos cortos son las anteriormente indicadas y el tratamiento fue de 20 y 30 min respectivamente. También se utilizó 4-aza-D,L-leucina (azaLeu, 2 g/L), un análogo estructural tóxico de la leucina.

Alternativamente a los agentes causantes de estrés, se provocó un estrés por ayuno de nitrógeno manteniendo las células en un medio sin nitrógeno (SD-N) durante 20 min previo lavado con el mismo medio.

#### 2.2.8.3. Inhibidores de la represión por glucosa

La represión por glucosa en medios con fuentes alternativas de carbono, como la sacarosa y el glicerol, se provocó añadiendo glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200 µg/mL), ambos análogos estructurales no metabolizables de la glucosa que impiden el crecimiento en los medios YPSac e YPGli, tanto en líquido como en placa. En medio de cultivo líquido, el ayuno de glucosa se produjo lavando las células de forma previa al experimento en el medio sin glucosa correspondiente (SD-Glu).

### 3. Métodos de manipulación genética de microorganismos

#### 3.1. Transformación de *Escherichia coli*

Las células competentes de *E. coli* se obtuvieron mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983; Sambrook y Russell, 2001). El protocolo seguido para la transformación de *E. coli* se detalla en Sambrook y Russell, (2001). Para la transformación de *E. coli* se parte de células competentes previamente descongeladas en hielo. Normalmente se suele añadir entre 1 y 20 ng de DNA en un volumen que no supere más del 5 % del volumen de las células competentes empleadas. Se invirtió cuidadosamente y se incubó en hielo 30 min. Posteriormente se llevó a cabo el choque térmico incubando a 42 °C durante 90 s; a continuación, se dejaron en hielo al menos 5 min. Las células se recuperaron añadiendo 8 volúmenes de medio LB durante 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, las células se sembraron en placas de medio selectivo LB con ampicilina 50 µg/mL.

#### 3.2. Construcción de mutantes de *S. cerevisiae*

La recombinación homóloga de secuencias cortas presentes en oligonucleótidos con los cuales se amplifican genes de selección es la estrategia que se utiliza para la obtención de mutantes de delección en levaduras. El marcador utilizado para las delecciones fue el marcador reciclable loxP-*kanMX*-loxP presente en el plásmido pUG6 (Guldener et al., 1996). Habitualmente, el *cassette* de disrupción se amplificó utilizando 100 pmoles de oligos de 60 nucleótidos llamados a y b (Tabla 4) y 50 ng del plásmido en un volumen de 100 µL (PCR preparativa). Para el etiquetado de proteínas con las etiquetas MyC<sup>13</sup> y GFP, el marcador utilizado también fue el marcador de resistencia a geneticina, pero en este caso, presentes en los plásmidos pFA6a-13Myc-KanMX6 y pFA6- GFP-KanMX6, respectivamente (Longtine et al., 1998). El *cassette* de etiquetado se amplificó de manera similar al *cassette* de delección; sin embargo, los oligos de 60 nucleótidos se llamaron Fw y Rv (Tabla 4).

Los *cassettes* obtenidos se purificaron mediante un kit de purificación de fragmentos de PCR (*Ultra clean®PCR clean-up kit* de MoBio o *mi-PCR Purification kit* de Metabion®); una vez purificados se utilizaron directamente para la transformación de las levaduras (ver más adelante).

Las colonias capaces de crecer en el medio selectivo (YPD + geneticina) se aislaron y se comprobaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos c (ceba en el promotor del gen delecionado) y el K2 (ceba en el gen *kanMX*). Al trabajar con cepas diploides es necesario detectar la presencia de copias adicionales intactas del gen en proceso de delección. Para ello, se utilizó la pareja de cebadores c y d (ceba en la ORF del gen que se ha eliminado durante la

delección). La comprobación del etiquetado de genes se realizó con el par de cebadores e (región 3' UTR) y K3.

Debido a que el marcador de selección utilizado (loxP-KanMX-loxP) de pUG6 está flanqueado por secuencias loxP se pueden obtener mutantes con delecciones múltiples o bien deleccionar las dos copias de un gen. Los sitios loxP son reconocidos por la recombinasa Cre del fago P1. Por ello, para eliminar el gen marcador se transforma otra vez pero con el plásmido YEp-cre-cyh (Delneri et al., 2000). Este plásmido posee la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen *GAL1* y un gen de resistencia a cicloheximida como marcador de selección. Así pues, los transformantes seleccionados se cultivaron en YPD con cicloheximida durante toda la noche. A continuación, se lavaron con YPGalactosa y se incubaron durante 3 h para permitir la expresión de la recombinasa Cre. Finalmente, se sembró la dilución correspondiente en YPD. Aquellas colonias capaces de crecer en YPD pero no en YPD + geneticina fueron seleccionadas para comprobarse mediante PCR. La eliminación del gen reportero se comprobó mediante el par de cebadores c/e, siendo e un oligo que ceba con la región 3' UTR del gen en cuestión. Así pues, se obtendrá en el caso de transformantes positivos una banda de menor tamaño si el gen reportero se ha eliminado.

Para la construcción de cepas sobreexpresantes de genes de interés se utilizó como molde para la PCR el plásmido pKanMX-MET17p con los oligos correspondientes para amplificar estos moldes y poder integrarse en la región promotora de dichos genes (Cardona et al., 2007; Orozco et al., 2013).

La construcción de mutantes *petite* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Curran y Carter, (1986). Se inoculó medio YPD a partir de células cultivadas durante toda la noche en medio SD. Se añadió bromuro de etidio (10 µg/mL) y se dejaron crecer 24 h a 24 °C. Al día siguiente se sembraron en YPDG (3 % glicerol, 0.1 % glucosa (w/v)) con la dilución correspondiente del cultivo. Las colonias aisladas de ese medio se sembraron de nuevo en un medio YPG (3 % glicerol) con el objetivo de observar si su respiración era deficiente.

### 3.2.1. Transformación de levaduras

Las transformaciones de *S. cerevisiae* se realizaron siguiendo el método del acetato de litio descrito por Ito et al. (1983) con las modificaciones introducidas por Gietz y Woods (2002). Se inocularon 50 mL de YPD, a una D.O.<sub>600</sub> de 0.2, a partir de un precultivo incubado toda la noche en YPD. Cuando el precultivo alcanzó una D.O.<sub>600</sub> aproximada de 2, las células se recogieron por centrifugación a 3500 rpm 2 min y se llevaron a cabo dos pasos de lavado con agua; el primero de ellos con 25 mL y el segundo con 1 mL. Las células se resuspendieron de nuevo en 1 mL de agua miliQ y se separaron alícuotas de 100 µL (tantas alícuotas como plásmidos o cassettes se van a transformar, más un control sin DNA). Después se realizó una centrifugación de 30 s a 12000 rpm para resuspender posteriormente las células en una mezcla de 240 µL de polietilenglicol 50 % (p/v) (peso molecular 3350), 36 µL de LiAc 1 M, 50 µL de DNA carrier 2 mg/mL y 34 µL del DNA para transformar completando hasta un volumen final de 360 µL con agua miliQ. Se incubó 20 min a 30 °C y otros 20 min a 42 °C, constituyendo así el choque térmico. Finalmente, la mezcla de transformación se sembró en placas de YPD, medio de recuperación, y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una réplica en placa YPD + geneticina o SD + cicloheximida.



## 4. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

### 4.1. Obtención de DNA

#### 4.1.1. DNA plasmídico bacteriano

Los plásmidos de *E. coli* se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001) basado en la lisis alcalina.

#### 4.1.2. DNA genómico de levadura

Se siguió el protocolo descrito por Legras y Karst (2003) con ciertas modificaciones. Se partió de precultivos de YPD de 5 mL cultivados a saturación. Las células se rompieron en 400 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 2 % (p/v), SDS 1 % (p/v)), 400 µL fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 600 µL perlas de vidrio. La rotura celular se produjo en tres tandas mediante un Fastprep®-24 a 5.5 de intensidad durante 20 s. Posteriormente, se añadieron 200 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM). Tras centrifugar, se volvieron a extraer con 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol 100 % con un lavado posterior con etanol al 70 % y se resuspendieron en tampón TE.

### 4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se utilizó para la construcción y la comprobación de las diferentes modificaciones genéticas realizadas en las cepas de levadura, así como para la amplificación del gen *GAT1* y elementos delta. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL (analítica) o 100 µL (preparativa). La mezcla de reacción fue la siguiente: 3.0 ng/ µL de DNA molde genómico o 0.4 ng/µL de DNA plasmídico, 1.0 pmol/µL de cada cebador, dNTPs 0.25mM, 1.0 U de mi-Taq only de Metabion o Taq-DNA polimerasa (Plus) de UVAT-Bio, tampón suministrado por la casa comercial con MgCl<sub>2</sub> respectivamente (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (v/v) Tween-20, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) y (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 a 25 °C), 0.1 % (p/v) Tritón X-100, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 1 min a 94 °C, 25-40 ciclos compuestos de 30 s a 94 °C, 45 s a temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable de extensión (1 min por cada kb) a 72 °C y finalmente un paso de extensión final de 10 min a 72 °C. Después de la reacción las muestras se guardaron a 4 °C.

Los transformantes de levadura se comprobaron mediante PCR analíticas utilizando como molde de DNA una colonia de levadura previamente resuspendida en 3 µL de NaOH 0.01 M, congelada a -80 °C unos segundos y calentada posteriormente a 95 °C durante 10 min provocando así la lisis celular.

El programa utilizado para las amplificaciones de los elementos delta es el siguiente (Legras y Karst, 2003): 4 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 4 min compuestos por 30 s a 95 °C, 30 s a 46 °C y 90 s a 72 °C, y un paso de extensión final de 10 min a 72 °C, utilizando los oligonucleótidos delta12-21. Legras y Karst (2003) diseñaron la pareja de cebadores delta12/delta21 con los que pudieron tipificar hasta 53 cepas de *S. cerevisiae*.

#### 4.2.1. Obtención de RNA total de levadura

Las extracciones de RNA se realizaron por cuadruplicado a partir de células procedentes de cultivos de 5 días de crecimiento en mosto sintético MS75. Una vez recogidas y lavadas con agua, las células procedentes de 10 mL de medio MS75 inoculado a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1, se resuspendieron en 0.5 mL de tampón TES (Tris- HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, SDS 0.5 %

(p/v), se añadieron 0.5 mL de fenol ácido y 1 volumen de perlas de vidrio. Se procedió a la rotura celular mediante agitación mecánica en un aparato FastPrep®-24 a 5.5 de intensidad durante 30 s con 3 repeticiones. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 min, el RNA se extrajo de nuevo con fenol:cloroformo (5:1) y se centrifugó de nuevo para extraer con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después de centrifugar, el RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de LiCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante 3 h. Se realizó un paso de lavado con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en agua libre de RNasas. La concentración de RNA se determinó mediante el aparato espectrofotométrico NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific).

#### 4.2.2. Análisis transcriptómico

La medida de la expresión génica mediante el uso de arrays de DNA se realizó a partir del RNA extraído en el Servicio de Genómica y Genética Traslacional del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se utilizaron 150 ng de RNA total de tres experimentos independientes para producir cRNA marcado con cianina 3-CTP con el kit *Low Input Quick Amp Labelling* de Agilent siguiendo las instrucciones del fabricante. Continuando con el protocolo *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* de Agilent, 600 ng de cRNA marcado se hibridaron con el microarray de expresión génica de levaduras (V2, 8x15K, de Agilent), el cual contiene más de 6256 sondas de *S. cerevisiae* (cepa S288c). Los arrays se escanearon en Agilent Microarray Scanner (G2565C de Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se extrajeron con el software Agilent Feature Extraction 11.5.1.1. Las categorías de Gene Ontology (GO) de los genes que están inducidos y reprimidos se obtuvieron mediante un análisis con el programa FuncAssociate 2.1 (Berriz et al., 2009).

#### 4.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa horizontales de entre 1 % y 2 % de agarosa (p/v) según el tamaño de los fragmentos a separar. El tampón utilizado de electroforesis, el cual también se utilizó para preparar los geles de agarosa, fue TBE 0.5 X (Tris-HCl 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM). Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xilencianol 0.25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)) y las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante entre 2.0-10 V/cm. La detección del DNA se realizó bajo luz fluorescente debido a que se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/mL) o GoldView DNA Safe Stain 0.05 % (v/v) (UVAT). Independientemente de la tinción utilizada, las imágenes de los geles se capturaron con una cámara Kodak Digital Science DC120.

#### 4.4. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

La purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se ha realizado utilizando el kit NA1111-1KT de Sigma-Aldrich® siguiendo las instrucciones del fabricante. Para favorecer la separación de las bandas, la electroforesis se realizó en un gel al 2 % (p/v) de agarosa. Posteriormente, se escindieron con una cuchilla las bandas, las cuales se visualizaron bajo luz azul para disminuir las mutaciones producidas por la luz ultravioleta.

#### 4.5. Secuenciación de fragmentos de DNA

La secuenciación por el método de Sanger se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. Las muestras, disueltas en agua en agua miliQ estéril, se cuantificaron mediante un equipo Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific).

## 5. Métodos de obtención y análisis de proteínas

### 5.1. Extracción de proteínas

La obtención de los extractos de proteínas fue diferente en función de la proteína a visualizar mediante *western blot* e inmunodetección. Tanto para el análisis de la fosforilación como para el estudio del nivel de expresión de proteínas (Pgk1p-GFP y Rps6p), las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con NaCl 0.9 % para, posteriormente, congelarlas a - 80 °C hasta la ruptura celular. Las proteínas se extrajeron en 500 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 1 M pH 7.5, NaCl 5 M, MgCl<sub>2</sub> 1 M, NP40 10 % (v/v), PMSF 0.1 M y una pastilla de inhibidores de proteasas comercial (complete Mini, EDTA-free de Roche)). Para evitar la defosforilación de las proteínas de interés por parte de las fosfatasas, se añadió al tampón de lisis tres inhibidores de fosfatasas: β-glicerolfosfato 1 M, sodio ortovanadato 0.5 M y NaF 1.25 M. El tampón de lisis para la visualización de Rps6p contenía adicionalmente Tween-20 al 0.5 % (v/v).

Una vez añadido el tampón de lisis, se hicieron 4 rondas de rotura de 20 s a intensidad 4.5 en el FastPrep®-24. El extracto se clarificó mediante centrifugación (10 min a 12000 rpm) y se cogieron dos alícuotas del sobrenadante. A una de las alícuotas se le añadió tampón de carga de proteínas 4X (Tris-HCl 240 mM pH 6.8, SDS 8 % (p/v), glicerol 40 % (v/v), β-mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.08 % (p/v)). La desnaturalización de las proteínas se realizó hirviendo 5 min a 100 °C. Las muestras se guardaron a - 20 °C hasta su utilización. La otra alícuota procedente del sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford (BioRad Inc).

La extracción de proteínas con el objetivo de visualizar la fosforilación de la proteína Snf1p y la migración electroforética de la proteína Gln3p se realizaron utilizando un protocolo de extracción con ácido tricloroacético (TCA) según Serra-Cardona *et al.*, (2014) con modificaciones de Orlova *et al.*, (2008). Se recogieron 5 unidades de D.O.<sub>600</sub> y se añadió ácido tricloroacético al 5.5 % (v/v). Se mantuvieron en hielo 15 min y las células se recogieron por centrifugación (2 min a 4 °C a 12000 rpm). Posteriormente se hicieron dos ciclos de lavado con acetona pura, se dejó secar al aire y se guardaron a - 80 °C. Una vez descongeladas, se procedió a la rotura celular mediante la adición de 150 µL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 EDTA 1 mM y 150 µL de NaOH 0.2 M. Después se centrifugó 1 min a 12000 rpm y el sedimento se resuspendió en 150 µL de tampón de carga de proteínas. Las proteínas se hirvieron a 100 °C durante 5 min para posteriormente centrifugar 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante de dicha centrifugación constituyó la muestra a analizar. Se cargaron 10 µL de sobrenadante por cada carrera del gel para la electroforesis de proteínas.

#### 5.1.1. Defosforilación de proteínas

Para aquellas proteínas cuya movilidad electroforética depende de su grado de fosforilación, se corroboró mediante tratamiento con fosfatasa lambda (Santa Cruz Biotechnology). En el caso de la extracción mediante tampón de lisis, el tratamiento se realizó sin inhibidores de fosfatasas con el extracto proteico procedente de la centrifugación mientras que para la extracción con TCA, el tratamiento con fosfatasa se realizó con el pellet obtenido después de la rotura celular.

En un volumen de reacción de 100 µL se añadió 80 µL de extracto proteico o pellet procedente de la extracción con TCA, 10 µL de tampón comercial 10X (500 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EGTA, 50 mM dithiotreitol y 0.1 % BRIJ 35), 10 µL MgCl<sub>2</sub> y 0.5 µL λ fosfatasa (Santa Cruz Biotechnology).

### 5.1.2. Cuantificación de proteína total

Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad) mediante una curva patrón con seroalbúmina bovina. De forma estándar, las electroforesis de proteínas se realizaron con 50 µg de proteína total.

### 5.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas

La extracción de las proteínas se realizó con el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos aunque el tampón de lisis fue ligeramente diferente (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glicerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, inhibidores de proteasas). Una vez clarificado el extracto, parte del sobrenadante se utilizó como INPUT (extracto total) y, por tanto, se le añadió directamente tampón de carga 4X y se hirvió a 100 °C durante 5 min; se recogieron otros 400 µL del extracto total a los cuales se le añadió 30 µL de perlas *anti-c-MyC agarose affinity gel antibody*, de Sigma. Previo al uso de las perlas, éstas se lavaron varias veces con el tampón de lisis. El extracto proteico se incubó durante toda la noche junto con las perlas en un agitador orbital a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 1 min. Se recogió una alícuota del sobrenadante, constituyendo así la Fracción No Retenida, y se le adicionó tampón de carga 4X y se hirvió 5 min a 100 °C. El resto del sobrenadante se eliminó. Se procedió a lavar las perlas con la proteína de interés unida por el epítipo MyC, con 200 µL de tampón de lisis. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 s retirando así el sobrenadante. A continuación, se le añadió tampón de carga 4X (sin β-mercaptoetanol) y se hirvió a 100 °C durante 5 min constituyendo así la Fracción Inmunoprecipitada. Todas las muestras se congelaron a - 20 °C hasta su uso.

### 5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

El análisis de las proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el sistema de mini geles X-Cell de Invitrogen. El gel separador está compuesto por tampón Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 % y cantidades variables de acrilamida a partir de un stock de acrilamida/bisacrilamida (grado de entrecruzamiento 37.5:1) del 40 % de VWR, según el tamaño de la proteína a analizar. Para la correcta separación de las proteínas Gat1p, Gpd1p, Pgk1p, Rps6p, α-tubulina y aquellas proteínas con consenso RRxS/T se utilizó un gel separador con 10 % de acrilamida; un 8 % para Snf1p; un 7.5 % para Par32p y finalmente, un 6 % para Gln3p. El pregel (gel concentrador) contiene Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1 % y acrilamida/bisacrilamida al 5 %. Se añadieron, tanto al pregel como al gel separador, persulfato amónico al 0.08 % y 5 µL de TEMED (N, N, N', N'- tetrametilendiamina) como iniciador y el catalizador de la reacción de polimerización, respectivamente. Las electroforesis se desarrollaron en tampón Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 192 mM), por norma general a 80 V durante el pregel y posteriormente el voltaje se aumentó a 125 V (aprox 25 mA) durante el gel separador. Todas ellas finalizaron cuando el azul de bromofenol llegó al final del gel (tiempo variable en función del porcentaje de acrilamida).

### 5.4. Transferencia del gel (*western blot*) e inmunodetección de proteínas

Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de polivinildenedifluoruro (PVDF) de Amersham Biosciences mediante el sistema Novex® Semi-Dry Blotter (*Life Sequencing*) durante 1 h a 5 V/125 mA. Las membranas se equilibraron 30 s en metanol, se hidrataron con agua y finalmente se humedecieron en tampón de transferencia (glicina 0.19 M, Tris 25 mM, SDS 0.1 % y metanol 20 % (v/v)).

Una vez realizada la transferencia, las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (5 % seroalbúmina bovina en PBS-T (NaCl 137 mM, 2.7 mM,

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM pH 7.3, Tween-20 0.1 %)). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario diluido convenientemente en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 min en PBS-T y se incubó una hora con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) diluido en PBS-T a temperatura ambiente. Por último, se realizaron otros 5 lavados de 5 min con PBS-T y se procedió al revelado de la membrana. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Anticuerpos utilizados en este trabajo.

Anticuerpo 1 <sup>ario</sup>	Procedencia	Dilución	Anticuerpo 2 <sup>ario</sup>	Procedencia	Dilución
Anti-Adh	Acris R1049	1:1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1:10000
Anti-MyC	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology/BioRad	1:10000/1:3000
Anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology	1:10000
Anti-eIF2αP (S51-S52)	Invitrogen	1:1000	Anti-conejo	BioRad	1:3000
Anti-eIF2α	John M. Zaborske	1:1000	Anti-conejo	BioRad	1:3000
Anti-Rps6 (S235-236)	Cell Signaling Technologies	1:1000	Anti-conejo	Santa Cruz Biotechnology/BioRad	1:10000/1:3000
Anti-Rps6	Cell Signaling Technologies	1:1000	Anti-ratón	Santa Cruz Biotechnology/BioRad	1:10000/1:3000
Anti-Pgk1	Invitrogen	1:1500	Anti-conejo	BioRad	1:3000
Anti-α-tubulina	Sigma-Aldrich (Merck)	1:1000	Anti-ratón	BioRad	1:3000
Anti-AMPKα (Thr172)	Cell Signaling Technologies	1:1000	Anti-conejo	BioRad	1:3000
Anti-poliHis	Sigma-Aldrich (Merck)	1:3000	Anti-ratón	BioRad	1:5000
Anti-PKA Substrat (RRXS*/T*)	Cell Signaling Technologies	1:1000	Anti-conejo	BioRad	1:3000

### 5.5. Revelado y cuantificación

La detección de las proteínas de interés se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit de revelado *ECL™ Prime /Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)* con una dilución 1:1 de las soluciones A y B. La captación de imágenes se realizó utilizando la cámara y el software de LAS-1000 de *Fujifilm* o LAS-500 de *GE Healthcare*.

### 5.6. Stripping

Una vez revelada la inmunodetección, se procedió a la eliminación de los anticuerpos en dos pasos de lavado de 10 min en tampón de *stripping* suave (15 g/L glicina, 1 g/L SDS, 10 mL/L Tween-20, pH 2.2). Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 min en PBS y finalmente dos lavados de 5 min en tampón TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20). A continuación se procedió de nuevo al bloqueo de la membrana con tampón de bloqueo, siguiendo las instrucciones indicadas en el apartado 5.4

## 6. Medida de parámetros bioquímicos

### 6.1. Análisis de los parámetros enológicos

#### 6.1.1. Determinación de azúcares reductores

El consumo de azúcares durante las microvinificaciones se determinó siguiendo el protocolo de Robyt y Whelan, (1972) con ciertas modificaciones. 100  $\mu$ L de una dilución 1:100 del sobrenadante procedente de la microvinificación se mezcló con un volumen del reactivo DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico 0.01 g/mL, NaOH 16 mg/mL, tartrato doble Na-K 0.3 g/mL) y se hirvió 5 min a 100 °C. Posteriormente se añadió a cada reacción 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se procedió a medir la absorbancia a 540 nm. La concentración de azúcares se determinó mediante interpolación con una recta patrón preparada a partir de una disolución stock de glucosa de 2 g/L.

#### 6.1.2. Determinación de etanol

La determinación de etanol se realiza mediante cuantificación enzimática utilizando alcohol deshidrogenasa. Para ello, se añade 1 mL de tampón Gly/Tris conteniendo el coenzima oxidado de la reacción (Glicina 0.2 M, Tris-HCl pH 9.7, NAD<sup>+</sup> 50 mM) a 200  $\mu$ L de una dilución 1:5000 del sobrenadante procedente del final de la microvinificación. Se procede a medir la absorbancia inicial a 340 nm. A continuación, se añaden 20  $\mu$ L de alcohol deshidrogenasa (20 U/mL, aprox. 4 mg/mL) y se mide la absorbancia de nuevo después de 15 min de incubación. La concentración de etanol se determina por interpolación de la recta patrón preparada a partir de etanol 1.2 mM.

#### 6.1.3. Determinación de $\alpha$ -aminoácidos

La determinación de  $\alpha$ -aminoácidos se realizó siguiendo la metodología de OPA/N-acetil-L-cisteína descrita en Dukes y Butzke, (1998). No se requiere dilución del sobrenadante procedente de la vinificación. Un volumen de 50  $\mu$ L de muestra se añade a 3 mL de solución A (NaOH 3.84 g/L, ácido bórico 8.468 g/L, N-acetil-L-cisteína 0.816 g/L) y otros 50  $\mu$ L a 3 mL de solución B (OPA 0.671 g/L NaOH 3.84 g/L, ácido bórico 8.468 g/L, N-acetil-L-cisteína 0.816 g/L y 10 % de etanol 95 %). Se procede a medir la absorbancia a 335 nm a partir de 10 min. La concentración de  $\alpha$ -aminoácidos se determina por interpolación de la recta patrón preparada a partir de isoleucina 10 mM.

#### 6.1.4. Determinación de amonio

La determinación de amonio se realizó utilizando el kit comercial MAK310 (*Ammonia Assay Kit*) de Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 6.1.5. Determinación de ácido acético, acetaldehído y glicerol

Estos metabolitos se determinaron utilizando kits de r-biopharm (*Roche*) según las instrucciones del fabricante.

#### 6.1.6. Determinación de cAMP

Para la determinación del cAMP se utilizó el kit RPN2251 (*GE Healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones descritas en García *et al.*, (2017). Se recogieron 15 unidades de D.O.<sub>600</sub> mediante centrifugación a 2500 rpm 3 min a 4 °C. Posteriormente, el sedimento se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su uso para la determinación del cAMP. Una vez descongelado el *pellet* en hielo, éste se lavó con PBS y se determinó el peso (peso húmedo). A continuación se añadió 350  $\mu$ L de *Lysis Reagent 2B* y 150  $\mu$ L perlas de vidrio para proceder a la ruptura celular utilizando 3 ciclos de rotura de

20 s a velocidad 4.5 m/s en un FastPrep-24. Se centrifugó 10 min a 4 °C a 12000 rpm y el sobrenadante constituyó la muestra a analizar mediante el inmunoensayo descrito en el mencionado kit. Las muestras se analizaron por triplicado.

## 6.2. Análisis del metaboloma

Las células creciendo en mosto sintético se recogieron en fase estacionaria cuando la concentración de azúcares reductores era aproximadamente 50 g/L y se congelaron inmediatamente para su envío y posterior análisis en la empresa *Metabolon*® (Durham, Nueva York). Las células, cinco muestras por cada condición, se prepararon usando un sistema automático Microlab STAR® de la compañía Hamilton. Las proteínas se precipitaron con metanol bajo una rotura vigorosa durante 2 min en un Glen Mills GenoGrinder 2000 y se centrifugaron. El extracto resultante se dividió en 5 alícuotas: dos de ellas para el análisis por (RP)/UPLC-MS/MS con un electrospray ionizante en modo iónico positivo (ESI), otra para el análisis por (RP)/UPLC-MS/MS con modo iónico negativo (ESI), una para el análisis por HILIC/UPLC-MS/MS con modo iónico negativo y otra muestra reservada como control. Los solventes orgánicos se eliminaron con TurboVap® (Zymark).

Todas las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) ACQUITY de Waters junto con un espectrómetro de masas Orbitrap (Thermo Fisher). Una vez deshidratados los extractos, éstos se reconstituyeron con diferentes solventes orgánicos para favorecer los pasos posteriores. Una de las alícuotas fue analizada en condiciones iónicas ácidas optimizadas cromatográficamente para compuestos hidrofílicos. Para ello, se utilizó una columna C18 (Waters UPLC BEH C18-2.1x100 mm, 1.7 µm), la cual se eluyó utilizando un gradiente de agua, metanol y 0.05 % de ácido perfluoropentanoico (PFPA) y 0.1 % de ácido fórmico. La otra alícuota restante, también analizada utilizando electrospray ionizante en modo iónico positivo, se pasó por una columna C18 y se eluyó mediante gradiente formado por metanol, acetonitrilo, agua, 0.05 % PFPA y 0.01 % ácido fórmico. La alícuota analizada mediante electrospray, pero en este caso, en modo iónico negativo, se eluyó de otra columna C18 mediante gradiente formado por metanol y agua pero con bicarbonato de amonio 6.5 mM pH 8.0. La cuarta alícuota fue analizada utilizando una columna HILIC (Waters UPLC BEH Amida 2.1x150 mm, 1.7 µm) utilizando un gradiente constante de agua y acetonitrilo con 10 mM de formato de amonio pH 10.8. Todas las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro MS/MS Orbitrap y los datos crudos se recogieron y se analizaron usando hardware y software de la empresa Metabolon®. Los metabolitos se identificaron por comparación con las librerías haciendo referencia al tiempo de retención, relación masa/carga y el cromatograma de todas las moléculas presentes en la librería.

La concentración de proteínas se normalizó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada metabolito se aplicó un análisis estadístico *t-Student* para averiguar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas.

## 6.3. Análisis de los parámetros de estrés

### 6.3.1. Cuantificación de trehalosa/ glucógeno

Tanto la cuantificación de la trehalosa como del glucógeno se realizó siguiendo el protocolo descrito por Parrou y François, (1997). Se recogieron 10 mg de peso seco de células por centrifugación (3500 rpm, 2 min). Las células se resuspendieron en 250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 250 mM y se incubaron 4 h a 95 °C. Posteriormente, se añadieron 150 µL de ácido acético 1 M y 600 µL de tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.2. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante

30 s. El sobrenadante se dividió en dos alícuotas; una para la determinación de trehalosa y la otra para la determinación de glucógeno.

Para la determinación de la trehalosa, se incubó el sobrenadante con 8.4 mU de trehalasa comercial (*Sigma*) en agitación a 37 °C durante 12-16 h. En dicha incubación también se añadió el blanco con extracto pero sin trehalasa. La cuantificación de trehalosa se determinó por interpolación en la recta patrón realizada entre 0 y 20 µg de trehalosa. La reacción se paró hirviendo las muestras. Posteriormente se centrifugaron y se valoró la glucosa liberada mediante ensayo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa.

Al sobrenadante utilizado para la determinación del glucógeno se le añadió 5 µL de amiloglucosidasa de *Aspergillus Níger* 100X (120 U/mL en agua). Posteriormente, se incubó durante toda la noche a 57 °C. Los controles se prepararon con extracto pero sin enzima. Las muestras se centrifugaron 30 s a 12000 g y la liberación de glucosa se valoró mediante ensayo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa.

### 6.3.2. Cuantificación de glucosa mediante el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa

La determinación de la glucosa se realizó siguiendo el protocolo de Zimmermann y Eaton (1974) con ciertas modificaciones. Se añadió a un volumen de 100 µL de muestra, 400 µL de la mezcla de reacción (7.8 U de glucosa oxidasa, 0.4 U de peroxidasa, 0.9 mM O-dianisidina en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.0). La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 30 °C y se detuvo añadiendo 500 µL de HCl 6 M. Posteriormente se midió la D.O.<sub>540</sub>. La cantidad de glucosa se calculó mediante interpolación con una recta patrón de glucosa realizada con cantidades de 0 a 10 µg.

### 6.4. Determinación de anión superóxido

La determinación de anión superóxido se realizó siguiendo las indicaciones de Klinger et al., (2010) con ciertas modificaciones. Las células se cultivaron en medio YPD y se recogieron 4 unidades de D.O.<sub>600</sub> tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. Se realizaron dos pasos de lavado con PBS (NaCl 137 mM, 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM pH 7.3) mediante centrifugación 2 min a 4000 rpm. Posteriormente, se resuspendieron en 200 µL de PBS con 10 µg/mL de DHE (dihidroetidio) y se pasaron a una placa multipocillo. Se incubaron durante 15 min a 30 °C en oscuridad y se midió la intensidad de fluorescencia en un lector de microplacas Varioskan LUX de *ThermoFisher*. La longitud de excitación y emisión fue 485 y 595 nm respectivamente.

## 7. Técnicas microscópicas

Todos los experimentos de fluorescencia se realizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i. Los experimentos para la localización de Gat1p y de Gln3p se realizaron en medio mínimo SD con 0.1 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en fase exponencial, momento en el cual se le añadió el inhibidor correspondiente (MSX 2 mM o rapamicina 200 ng/mL) o bien se cambió a un medio sin nitrógeno.

La visualización de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 mg/mL) y la membranas vacuolares con MM4-64 40 µM (N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio de bromuro. En ambos casos la incubación se realizó en oscuridad. Acabado el tiempo de incubación se realizó un paso de



lavado en el medio correspondiente para eliminar el exceso de fluorescencia y se observaron las células bajo el filtro correspondiente.

## 8. Tratamiento estadístico de los datos

En los resultados de carácter cuantitativo en los que se muestra un análisis estadístico de los datos, se realizó un test t de student de una cola con dos grados de libertad para comparar las medias de dos categorías dependientes a través de la desviación típica (DT). Se consideran valores significativos aquellos con un valor de p (p-value) menor o igual a 0.05, lo que corresponde a un intervalo de confianza del 95 %.

Tanto los análisis gráficos como estadísticos de las fermentaciones a pequeña escala del análisis fenómico se llevaron a cabo utilizando el software R (Team R. Core, 2018). La variación de cada rasgo se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) usando la función *aovp* del paquete *ImPerm*. Se aplicó el test de Tukey sobre los resultados del ANOVA para determinar qué grupo de medias eran significativamente diferentes utilizando la función *HSD.test* (paquete *agricolae*). El análisis de componentes principales (PCA) se calculó utilizando el paquete *ade4*. En caso necesario, se aplicó una comparación no paramétrica de las muestras utilizando el test de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $\alpha = 0.05$ ). Los *heat maps* se obtuvieron utilizando la función *heatmap.2* del paquete *Stats* a partir de los datos normalizados de los parámetros cinéticos y enológicos de los mutantes de delección construidos en la cepa C9.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



# Capítulo 1

---

## **RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE NUTRIENTES EN CONDICIONES DE VINIFICACIÓN: ANÁLISIS Y MODIFICACIÓN MEDIANTE EVOLUCIÓN DIRIGIDA.**

En este capítulo se aborda el estudio de las rutas de señalización de nutrientes en condiciones de laboratorio y de vinificación con el objetivo de investigar la comunicación cruzada entre ellas en cepas vínicas. Gran parte de los estudios realizados en *S. cerevisiae* utilizan como referencia cepas de laboratorio que, a diferencia de las utilizadas en ambientes industriales, han sido cultivadas en condiciones y medios óptimos, mientras que las cepas industriales deben hacer frente a condiciones no óptimas de crecimiento. Se pretende dilucidar las diferencias entre ambos tipos de cepas, así como utilizar la evolución dirigida, una de las técnicas más actuales para la obtención de cepas mejoradas, usando compuestos químicos cuyas dianas forman parte los mecanismos de respuesta a los nutrientes. Finalmente, se analiza el estado de activación de las principales rutas de señalización de nutrientes en condiciones de laboratorio y de vinificación para intentar definir qué hace que las cepas vínicas sean adecuadas para la vinificación.

### **1. Análisis de fenotipos diferenciales respecto a la señalización de nutrientes en cepas vínicas**

El mosto de uva se caracteriza por presentar una concentración de nitrógeno baja por lo que la selección de cepas de levadura para vinificación considera los requerimientos de nitrógeno (bajo, medio o elevado) un criterio importante que se incluye en la ficha técnica de los inóculos comerciales, junto con otras características relevantes, como la velocidad de fermentación, la producción de glicerol o la tolerancia al alcohol. Como se ha comentado anteriormente, para evitar ralentizaciones y paradas en la fermentación es necesario seleccionar la cepa en función de la concentración de nitrógeno asimilable del mosto y del tipo de vino a producir. Se seleccionaron 16 cepas de levaduras vínicas industriales con diferentes requerimientos de nitrógeno con el objetivo de analizar su sensibilidad a inhibidores químicos cuyas dianas son, directa o indirectamente, las rutas de señalización de nutrientes con el fin correlacionar la funcionalidad de dichas rutas con sus requerimientos de nitrógeno.

#### **1.1. Análisis del consumo de azúcares**

Para comprobar si existía correlación entre los requerimientos de nitrógeno teóricos y la capacidad de la levadura para completar una vinificación limitante en nitrógeno se realizaron vinificaciones en mosto sintético MS68, concentración deficiente de nitrógeno, con las 16 cepas seleccionadas y se determinó el tiempo que tardaban en finalizar la fermentación (< 5 g/L de azúcares reductores). Los resultados de las fermentaciones junto con los requerimientos de las cepas se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Tiempo de vinificación (< 5 g/L de azúcares reductores) de cepas industriales con diferentes requerimientos de nitrógeno (alto ↑, bajo ↓ o medio M) en mosto sintético MS68. Las cepas mostradas en rojo se seleccionaron para análisis posteriores. N.D.: No disponible.

Cepas	Requerimiento N <sub>2</sub>	Días finalización fermentación
L2056	M	21
71B	↓	21
DV10	↓	21
CY3079	↑	21
CKS102	↑	23
BCS103	↓	25
M2	↑	26
T73	↓	26
EC1118	↓	26
RC212	↑	26
CSM	M	34
UCLMS235	↑	34
UCLMS377	↑	34
BM45	↑	34
IFI 367	N.D.	34
IFI 391	N.D.	34

El requerimiento de nitrógeno hace referencia a la cantidad de nitrógeno necesaria para mantener la tasa de fermentación constante en fase estacionaria, ya que gran parte del consumo de azúcares tiene lugar en dicha fase, y por tanto, si debe suplementarse al mosto para que la fermentación tenga lugar en condiciones controladas. Dicho requerimiento, así como la eficiencia de fermentación difiere entre cepas, tal como se muestra en la Tabla 7.

Si bien es cierto que en el ámbito industrial el mosto puede ser suplementado con fosfato de diamonio para aumentar la concentración de nitrógeno, la vinificación se realizó en mosto sintético MS68 para intensificar los fenotipos de las cepas. Además, la adición excesiva de nitrógeno al mosto puede dar lugar a contaminaciones adicionales y a productos aromáticos indeseables como consecuencia del nitrógeno no consumido. Por ello, es necesario conocer correctamente los requerimientos de nitrógeno de las distintas cepas.

Las cepas IFI 367 e IFI 391 (Instituto de Fermentaciones Industriales, IFI) se añadieron como controles de cepas aisladas de entornos industriales con deficiencias en la fermentación (Zuzuarregui y del Olmo, 2004), aunque no se dispone de datos de requerimiento de nitrógeno por no ser comerciales. Las fermentaciones en mosto natural con estas cepas se paran cuando la concentración de azúcares reductores está alrededor de 135-155 g/L. En la vinificación realizada en MS68, ambas cepas finalizan la fermentación a tiempos largos (34 días), como otras cepas para las que si se conoce el requerimiento elevado (UCLM S235, UCLM S377 y BM45), y la cepa CSM, a pesar de presentar un requerimiento medio.

Las cepas que menos tardan en finalizar la fermentación son la L2056, 71B, DV10 y CY3079, dos de ellas con bajo requerimiento (71B y DV10) y dos con medio y alto (L2056 y CY3079, respectivamente), indicando que los requerimientos de nitrógeno no correlacionan perfectamente con la capacidad de finalizar la fermentación en nuestras condiciones. Dado

que la clasificación comercial se basa en evidencia experimental en diversos mostos naturales se mantendrá esa categorización a lo largo de toda la tesis.

## 1.2. Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno

Se analizó a continuación el crecimiento en presencia de compuestos que afectan a diversas etapas del metabolismo del nitrógeno, creando ayunos concretos, con la finalidad de relacionar las dianas concretas inhibidas y las rutas a las que pertenecen con el fenotipo global de las distintas cepas.

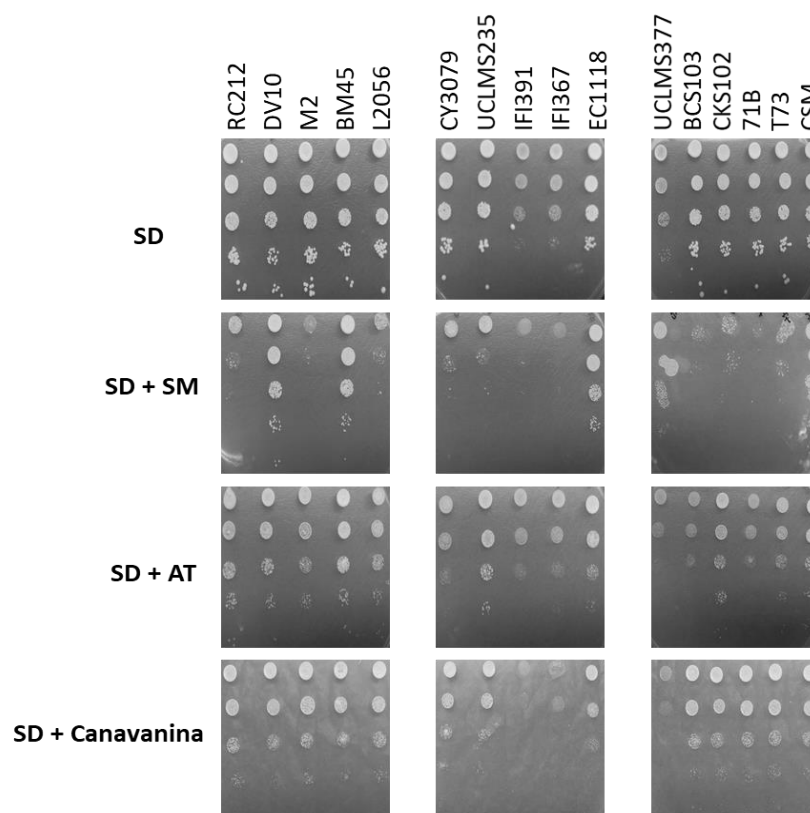
### 1.2.1. Efecto de inhibidores químicos de la síntesis de aminoácidos en el crecimiento.

Se realizaron goteos en placa en medio mínimo SD, carente completamente de aminoácidos, con diversos inhibidores químicos de la síntesis y transporte de aminoácidos, cuyos resultados se muestran en la Figura 12. Los inhibidores se suministraron a concentraciones que disminuyen o dificultan la síntesis de determinados aminoácidos pero no la bloquean completamente puesto que, de hacerlo, serían letales en medio mínimo SD. Dicho medio presenta el sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, la deficiencia de crecimiento en presencia de un inhibidor de un paso esencial en la síntesis de aminoácidos indicaría un problema en la movilización del nitrógeno presente en la célula; pues el grupo amonio es utilizado para la síntesis de compuestos nitrogenados. Las cepas IFI 391, IFI 367 y UCLM S377 presentan ya un defecto en el crecimiento en medio mínimo, defecto que impide detectar fenotipos en presencia de inhibidores.

El sulfometuronmetil inhibe la acetolactato sintetasa por lo que la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada se reduce, causando un ayuno parcial de nitrógeno. El crecimiento de las cepas DV10 y EC1118, con requerimientos bajos de nitrógeno, y BM45, con alto, no se ve afectado por dicho compuesto, por lo que las diferencias de requerimiento no se relacionarían con la síntesis de aminoácidos ramificados.

En el caso del 3-aminotriazol no se observan grandes diferencias fenotípicas entre cepas. El AT causa un ayuno de histidina al inhibir la glicerol fosfato deshidratasa codificada por el gen *HIS3*. Las cepas UCLM S235, CKS102 y BM45, todas ellas con altos requerimientos de nitrógeno, muestran una ligera tolerancia a AT respecto de las demás, aunque no suficiente para obtener conclusiones.

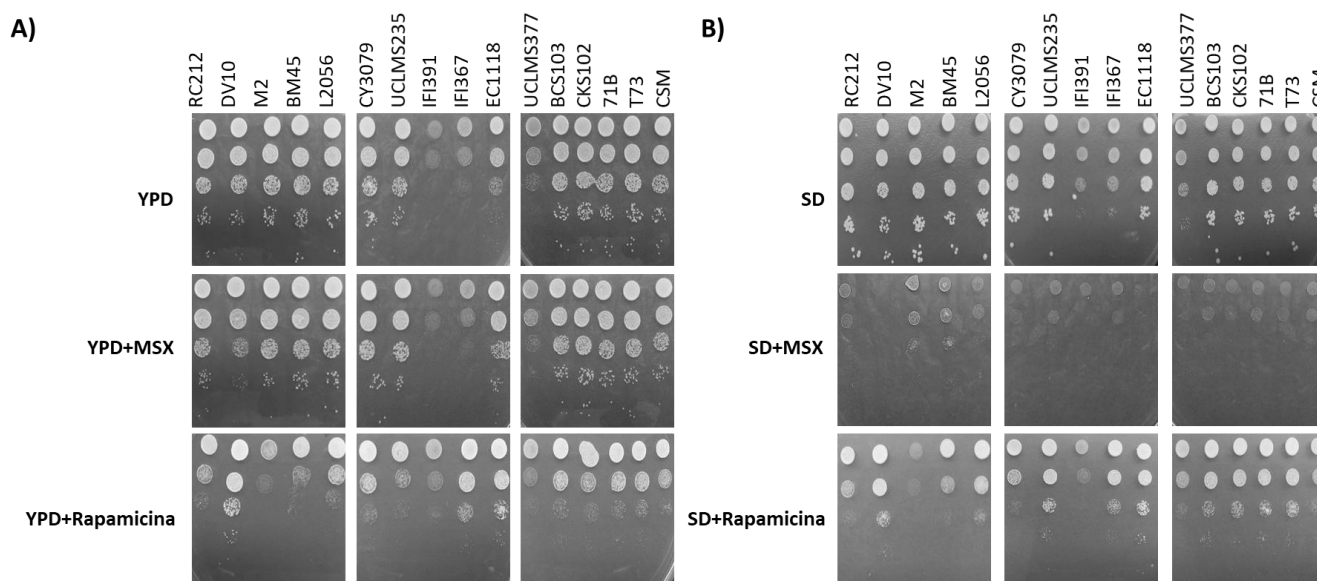
También se analizó el crecimiento en presencia de L-canavanina, análogo tóxico de la arginina que se utiliza para determinar la captación de este aminoácido por el transportador Can1p. Tampoco se observan diferencias de crecimiento entre cepas en presencia de este inhibidor. Los goteos realizados indican que no existe relación entre los requerimientos de nitrógeno observado y las etapas del metabolismo del nitrógeno ensayadas.



**Figura 12.** Respuesta de diversas cepas vínicas al ayuno de nitrógeno. Goteos en medio mínimo SD en presencia de sulfometuronmetil (SM, 1 mg/L), 3-aminotriazol (AT, 10 mM) y L-canavanina (Canavanina, 20 mg/L).

### 1.2.2. Efecto de inhibidores químicos que causan inactivación de TORC1 en el crecimiento

En este apartado se analizó la resistencia de las 16 cepas seleccionadas a inhibidores químicos que causan la inactivación del complejo TORC1 directa o indirectamente, concretamente rapamicina y L-metionina sulfoximina, respectivamente. La rapamicina inhibe directamente a TORC1 causando un déficit en el crecimiento, mientras que el MSX causa un ayuno de glutamina al inhibir la glutamina sintetasa y, como consecuencia, inhibe parcialmente a TORC1 (Crespo et al., 2002; Stracka et al., 2014). Los goteos se realizaron tanto en medio mínimo SD como en medio completo YPD, que se diferencian en la fuente de nitrógeno, ya que el sulfato de amonio es la única fuente de nitrógeno presente en el medio mínimo SD mientras que el medio YPD posee extracto de levadura y peptona que aportan aminoácidos y péptidos. Los resultados de los goteos se observan en la Figura 13.



**Figura 13.** Respuesta de diversas cepas vínicas al ayuno de nitrógeno causado por la inhibición del complejo TORC1 mediante goteos en placa en presencia de rapamicina (100 nM) o L-metionina sulfoximina (MSX, 1 mM) tanto en medio rico YPD (A) como en medio mínimo SD (B).

En el medio completo YPD las cepas IFI 391, IFI 367 y UCLM S377 vuelven a tener un déficit de crecimiento, igual al observado en medio mínimo SD. El MSX en medio rico no parece tener un efecto determinante, pues todas las cepas a excepción de DV10 y EC1118, ambas de bajos requerimientos de nitrógeno, y la cepa UCLM S377, con alto, son capaces de crecer incluso en la última dilución. La sensibilidad a MSX en medio mínimo es mucho mayor y los fenotipos observados para MSX en medio rico YPD se mantienen en medio mínimo SD respecto a la sensibilidad elevada de las cepas DV10, EC1118 y UCLM S377.

El fenotipo causado por la rapamicina es independiente del medio utilizado. Aunque siempre se ha considerado que el fenotipo causado por la rapamicina es similar al ayuno de nitrógeno respecto a la inhibición de TORC1, parece que difiere en ciertos aspectos (Kulkarni et al., 2006; Rai et al., 2015; Tate et al., 2009, 2015). Las cepas RC212, M2, BM45 y UCLM S377 son más sensibles a la rapamicina que el resto de las cepas. Todas ellas tienen en común unos requerimientos elevados de nitrógeno lo que indicaría una cierta relación con la regulación de la ruta TORC1. Sin embargo, cepas como UCLM S235 y CKS102, que también presentan requerimientos elevados, son bastante más resistentes a la rapamicina. Además, la cepa CSM también presenta un fenotipo similar a las más sensibles a rapamicina y su requerimiento es considerado como medio.

Al no observar correlación entre los requerimientos de nitrógeno y la resistencia a un determinado inhibidor, se seleccionaron las cepas DV10, CSM, M2 y EC1118 (señalizadas en rojo en la Tabla 7) en función de los requerimientos de nitrógeno, el tiempo de finalización de la fermentación y los fenotipos observados en los experimentos de respuesta a la disponibilidad de fuente de nitrógeno. Las cepas DV10 y EC1118 presentan fenotipos similares frente a MSX y rapamicina y ambas presentan bajos requerimientos de nitrógeno. Por otro lado, las cepas M2 y CSM, de requerimiento alto y medio de nitrógeno, también presentan fenotipos similares frente a los inhibidores químicos analizados y, en general, diferente al anterior grupo.

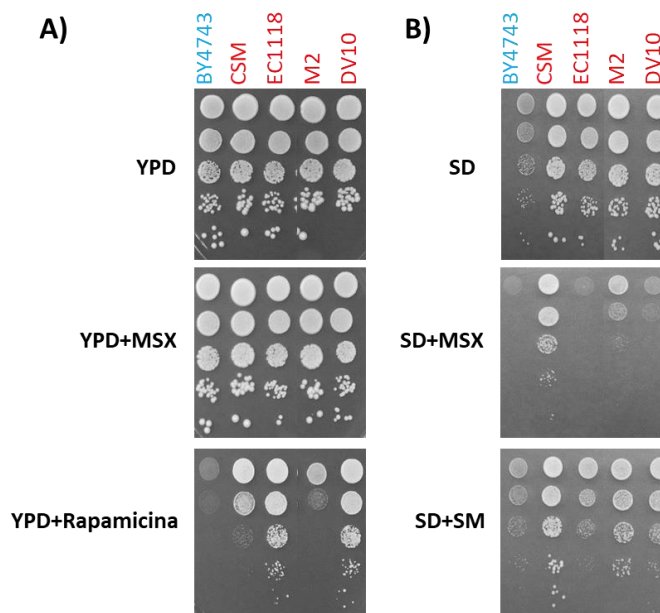


Los experimentos descritos muestran que los inhibidores analizados no son una buena herramienta para prever las necesidades de nitrógeno de las cepas vínicas ya que no se observa una correlación clara entre dicha necesidad y la mayor o menor tolerancia a un determinado inhibidor. Sin embargo, sí dejan patente la importancia de las diferentes rutas de señalización de nutrientes debido al amplio grado de variabilidad entre las cepas vínicas.

### 1.3. Análisis del crecimiento en medios con diferentes características nutricionales y comparación con cepas de laboratorio

Se abordó a continuación la comparación de la tolerancia a los inhibidores analizados de las cepas vínicas con la de cepas de laboratorio. Se seleccionó la cepa diploide de laboratorio BY4743, derivada del cruce entre BY4741 y BY4742, ambas procedentes de S288c (Baker Brachmann et al., 1998), lo que impone la adición al medio de cultivo de histidina, leucina y uracilo debido a sus auxotrofías. Los resultados de los goteos se muestran en la Figura 14.

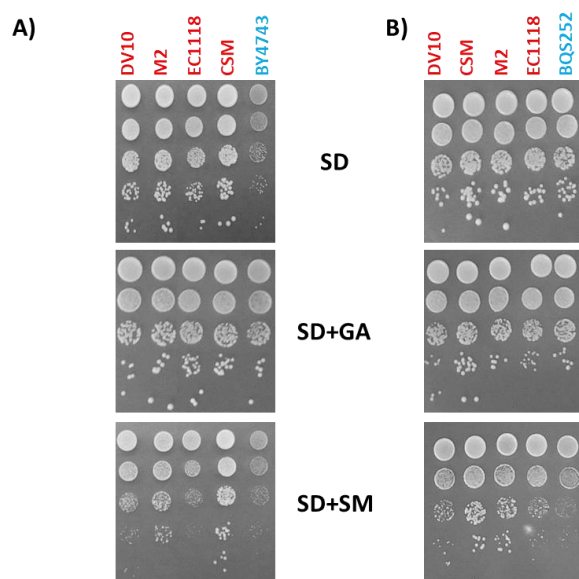
En presencia de MSX, inhibidor de la síntesis de glutamina, la cepa BY4743 presenta una sensibilidad muy elevada en medio mínimo pero no en medio completo YPD, probablemente, por la presencia de otras fuentes de nitrógeno en el YPD. La mayor resistencia a rapamicina de las cepas DV10 y EC1118, ya observada anteriormente (Figura 13), queda más patente al compararla con la tolerancia tan baja a dicho compuesto de la cepa de laboratorio BY4743, más sensible que ninguna de las cepas vínicas. Las cepas DV10 y EC1118 son genéticamente similares pues se agrupan dentro del clado conocido como *Prise de Mousse* (Borneman et al., 2016) por lo que el mecanismo que les proporciona una mayor tolerancia a rapamicina puede ser común a ambas. El fenotipo observado para el sulfometuronmetil es muy similar al observado para el MSX.



**Figura 14.** Análisis de crecimiento comparado en presencia de inhibidores químicos de las cepas vínicas seleccionadas y de la cepa de laboratorio BY4743. Goteos en placas en medio rico YPD (A) y en medio mínimo SD (B), en presencia de rapamicina (100 mM), cafeína (10 mM) o L-metionina sulfoximina (MSX, 1 mM). Los medios se han suplementado con los aminoácidos correspondientes para suplir las auxotrofías de la cepa BY4743. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

Debido a las diferencias observadas en la tolerancia a MSX de la cepa de laboratorio en función del medio estudiado, se investigó si la adición de los aminoácidos para suplir las auxotrofías de la cepa BY4743 podría también influir en la respuesta de las cepas vínicas frente a los inhibidores químicos. Para ello, se realizaron goteos en medio mínimo SD con la cepa de laboratorio BQS252, que presenta únicamente auxotrofia para uracilo, y no para aminoácidos. La ventaja de utilizar esta cepa de laboratorio como control para comparar con las cepas vínicas es que el uracilo, a diferencia de los aminoácidos, se considera una fuente de nitrógeno no preferida por *S. cerevisiae* por lo que su adición al medio para complementar la auxotrofia no aporta fuente de nitrógeno capaz de sustentar el crecimiento de la levadura. En la Figura 15 se muestran los goteos realizados en medio mínimo SD con las cepas de laboratorio BY4743 (panel A) y la cepa BQS252 (panel B).

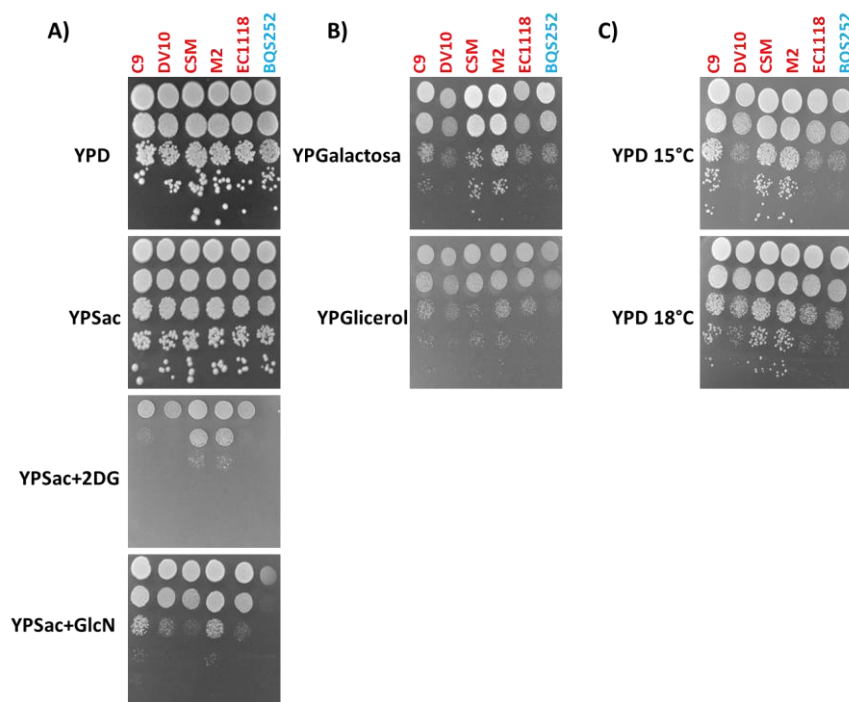
Las diferencias observadas frente a los inhibidores no son idénticas en los dos medios con diferentes suplementos nutricionales. En el caso del glufosinato de amonio, de modo de acción similar al MSX, y el SM, el fenotipo de M2 y EC1118 es más acusado en las placas que únicamente contienen uracilo. Para evitar posibles interferencias en el crecimiento causadas por la adición de aminoácidos necesarios para el crecimiento de la cepa BY4743, se optó por utilizar la cepa BQS252 debido a que presenta el uracilo como única auxotrofia, pudiendo obviarse la adición de aminoácidos.



**Figura 15.** Comparación de los fenotipos observados frente a diversos inhibidores químicos en medio mínimo SD con los aminoácidos suplementados en función de la cepa de laboratorio utilizada. Medio mínimo SD con los requerimientos necesarios para suplir las auxotrofías de la cepa BY4743 (histidina, leucina y uracilo) (A) y medio mínimo SD con uracilo para suplir la auxotrofia de la cepa BQS252 (B). Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

Se decidió ampliar el estudio al comportamiento frente a análogos estructurales de la glucosa, como la 2-desoxiglucosa o la glucosamina, que emulan la represión catabólica por glucosa y, por tanto, inhiben el crecimiento en presencia de sacarosa. Ambos análogos inhiben fuertemente el crecimiento de la cepa de laboratorio BQS252 y parcialmente el crecimiento de las cepas vínicas analizadas, Figura 16 panel A. La mayor tolerancia frente a 2DG y GlcN sugiere que las cepas vínicas presentan una represión por glucosa menos potente, lo que justificaría su mayor crecimiento en presencia de otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa como la galactosa o el glicerol, Figura 16 panel B. A diferencia de lo observado

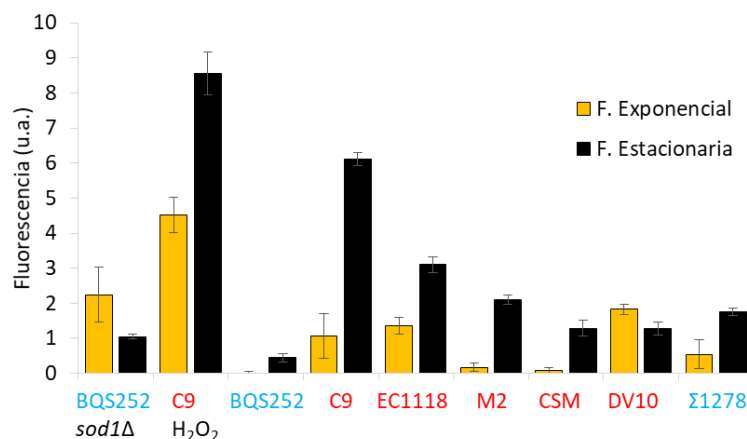
anteriormente, donde las cepas EC1118 y DV10 presentaban una mayor tolerancia a rapamicina, éstas son más sensibles a 2DG y GlcN que las cepas CSM y M2. También se analizó la capacidad de estas cepas a crecer en frío. Aunque también existe cierta variabilidad en la tolerancia a bajas temperaturas, las diferencias en el crecimiento no permiten una separación tan clara entre la cepa de laboratorio y las cepas vínicas, Figura 16 panel C, aunque sí vuelve a haber un agrupamiento entre las cepas DV10 y EC1118 que las diferencia de M2 y CSM.



**Figura 16.** Tolerancia de las cepas vínicas seleccionadas frente a diversos inhibidores químicos, temperatura y fuentes de carbono. Goteos en presencia de los análogos estructurales 2-desoxiglucosa (2DG, 200 µg/mL) o glucosamina (GlcN, 0.05 %) en medio YPSacarosa (YPSac) (A). Goteos en medios con diferentes fuentes de carbono, YPGalactosa (2 %) e YPGlicerol (2 %) (B). Goteos cuya incubación se ha realizado a 15 °C durante 4 días o a 18 °C durante 3 días (C). Rojo: cepas vínicas. Azul: cepas de laboratorio.

La variabilidad de la tolerancia frente a rapamicina observada entre las cepas vínicas (Figura 14 panel A) podría estar relacionada con diferencias en el estado redox intracelular, ya que se ha descrito que niveles elevados de anión superóxido modifican la unión del complejo Fpr1p-Rapamicina al complejo TORC1, aumentando así la resistencia a rapamicina (Neklesa y Davis, 2008). Se midieron los niveles de anión superóxido mediante la sonda fluorescente DHE (dihidroetidio) tanto en fase exponencial como en fase estacionaria en medio completo YPD, Figura 17, tal y como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2). Se incluyó como control un mutante de delección del gen *SOD1* (*sod1Δ*) en la cepa de laboratorio BQS252, en la que la deficiencia de actividad superóxido dismutasa produce una mayor acumulación de anión superóxido. Además, también se incluyó, como controles positivos adicionales, la cepa vínica haploide C9 tratada con peróxido de hidrógeno y la cepa Σ1278, cepa de laboratorio con elevada resistencia a rapamicina (Zurita-Martinez y Cardenas, 2005). A excepción de la cepa DV10, todas las cepas analizadas presentan una acumulación de anión superóxido mayor en fase estacionaria que en fase exponencial de crecimiento, un fenotipo esperado ya que la acumulación de ROS se asocia con el envejecimiento cronológico. Las cepas vínicas presentan tanto en fase exponencial como en fase estacionaria más superóxido que la cepa de

laboratorio de referencia BQS252. No se observa una correlación entre la tolerancia a rapamicina y la mayor presencia de anión superóxido en fase estacionaria entre las cepas vnicas. No obstante, en fase exponencial donde TORC1 se supone que está activo, las cepas EC1118 y DV10, ambas más resistentes a rapamicina, sí que presentan niveles mayores de anión superóxido respecto a las cepas M2 y CSM.



**Figura 17.** Medida de anión superóxido en cepas vnicas y de laboratorio. La cuatificación se realizó mediante fluorescencia con el reactivo dihidroetidio (DHE) en fase exponencial (color naranja) y en fase estacionaria (color negro) en medio YPD para las cepas indicadas incluyendo el mutante *sod1Δ* y la adición de peróxido de hidrógeno (30 %, (v/v) a la cepa C9. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vnicas.

El uso de inhibidores químicos permite observar una amplia variabilidad fenotípica que sugiere diferencias en las rutas de señalización de nutrientes. De entre todos los inhibidores o condiciones analizadas, cabe destacar la mayor tolerancia de las cepas vnicas tanto a la rapamicina como a los análogos de glucosa 2DG y GlcN, indicando que las cepas vnicas y las de laboratorio responden diferencialmente a los dos nutrientes principales, las fuentes de nitrógeno y de carbono.

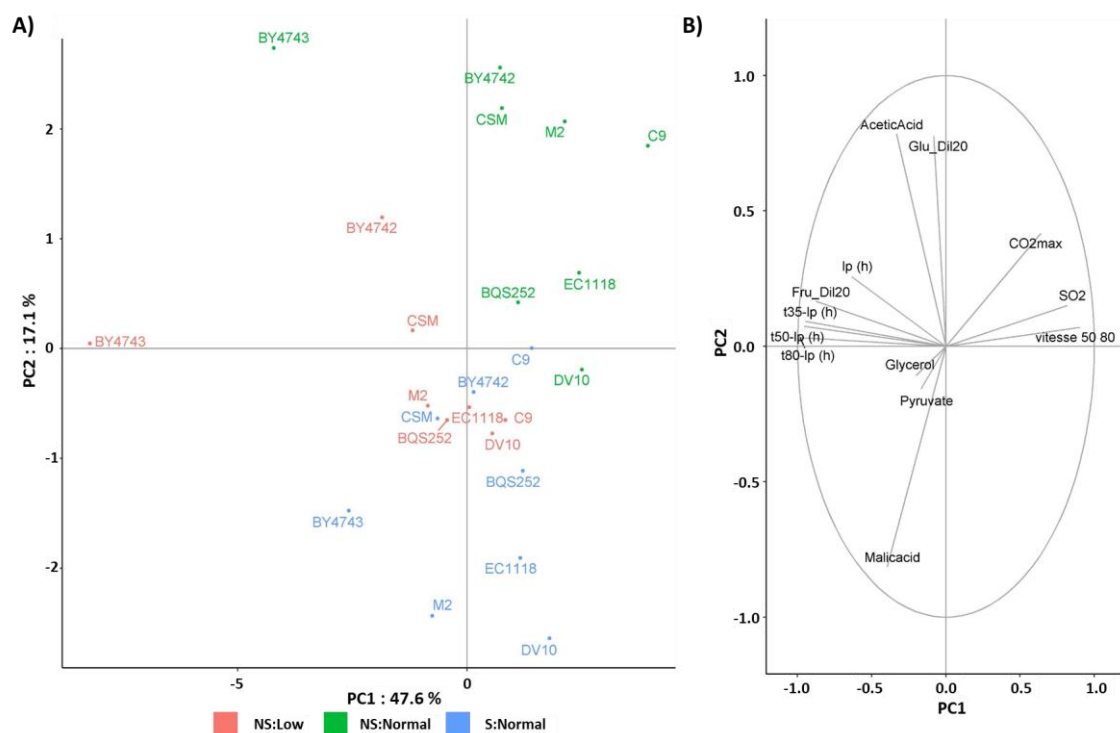
#### 1.4. Análisis fenómico en condiciones de vinificación

Los ensayos de tolerancia de las cepas vnicas realizados tanto frente a rapamicina (Figura 14 panel A) como a 2-desoxiglucosa (Figura 16 panel A) muestran las diferencias entre las diversas cepas vnicas. Dado que los estudios anteriores sugieren una diferente señalización por nutrientes en las cepas vnicas respecto del comportamiento, más estudiado, de las cepas de laboratorio, se realizaron vinificaciones durante la estancia en el laboratorio de Philippe Marullo en mosto Sauvignon Blanc con las cepas vnicas EC1118, M2, DV10 y CSM y la cepa vnica haploide C9, junto con las cepas de laboratorio BY4743 (diploide), BY4742 y BQS252, con la finalidad de comparar parámetros cinéticos y enológicos.

Aunque *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva, el oxígeno es de gran importancia durante las fermentaciones alcohólicas ya que es necesario para la síntesis de lípidos. Sin embargo, una adición excesiva de oxígeno puede ser perjudicial puesto que los compuestos presentes en el mosto pueden oxidarse dando lugar a características indeseables. Además, concentraciones elevadas de oxígeno favorecen las contaminaciones (Blateyron y Sablayrolles, 2001; du Toit et al., 2006). Por ello se optó por realizar las vinificaciones en condiciones de microoxigenación, donde la agitación permite la transferencia suficiente de oxígeno para la síntesis de lípidos, pero no en cantidades que sean perjudiciales. Al ser el oxígeno y el

nitrógeno dos factores importantes a tener en cuenta durante la fermentación, se diseñaron tres condiciones: con agitación y mosto suplementado (S:Normal) (250 mg/L de Yeast Assimilable Nitrogen, YAN), sin agitación y mosto suplementado (NS:Normal) (250 mg/L de YAN), y sin agitación y mosto sin suplementar (NS:Low) (100 mg/L de YAN). Las fermentaciones, independientemente de si se realizaron en agitación o no, se llevaron a cabo a 24 °C y, cuando se requería, los viales se agitaron a 175 rpm en un agitador orbital. La condición NS:Normal es la más parecida a las condiciones de fermentación en bodega por lo que puede considerarse como la condición de referencia; la condición S:Normal permite determinar el efecto del oxígeno y la influencia de la respiración mientras que la condición NS:Low se considera un ayuno relativo de nitrógeno. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos ( $l_p$ ,  $t_{35/50/80-l_p}$ ,  $v_{50\_80}$ ) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el  $SO_2$ , la glucosa y la fructosa. Por limitaciones técnicas, el etanol no pudo determinarse.

En la Figura 18 se observa el análisis global de las cepas analizadas a lo largo de la vinificación en las tres condiciones analizadas. En el panel A se muestra el análisis de componentes principales (PCA), donde se observa la agrupación de las cepas en función de las condiciones analizadas. Salvo las cepas BY4743 y DV10, las demás cepas analizadas en la condición NS:Normal (verde) se agrupan en el cuadrante superior derecho. La agrupación de las cepas de laboratorio con auxotrofías para aminoácidos (BY4743 y BY4742) se hace menos acusada en la condición de crecimiento más similar a las condiciones de laboratorio (S:Normal). A destacar el comportamiento de la cepa BQS252 que, siendo una cepa de laboratorio, se agrupa principalmente con las cepas vínicas seleccionadas, indicando que las auxotrofías en la síntesis de aminoácidos es el determinante genético que más diferencia un tipo y otro de cepas. Respecto al círculo de correlación (Figura 18 panel B), se observa la agrupación de los parámetros cinéticos y enológicos medidos a lo largo de la vinificación en todas las condiciones. La longitud de la flecha indica si la agrupación observada en el PCA (panel A) es apoyada por el parámetro observado. Por lo tanto, cuanto más longitud tenga la flecha, más apoyará la agrupación observada en el PCA. Por otra parte, es importante la relación entre las variables y su posición en el gráfico. Si las variables están cerca (ángulo pequeño), la relación es positiva; si el ángulo es de 90 °, no hay relación alguna; mientras que si están en lados opuestos (ángulo 180 °), la relación es negativa. Por ejemplo, la agrupación de los tiempos para liberar  $CO_2$  ( $t_{35-50-80-l_p}$ ) es contraria a la velocidad de producción ( $v_{50-80}$ ), tal y como cabía esperar al ser parámetros inversos. El ácido málico, el piruvato y el glicerol se contraponen al  $CO_2$  liberado, indicando que son productos de la fermentación de los azúcares. La corta longitud de la flecha del glicerol y del piruvato sugieren un menor apoyo a la agrupación observada (más adelante en panel C y D de la Figura 19). Las modificaciones dirigidas al incremento de glicerol suelen acompañarse de un aumento correlativo de ácido acético (Remize et al., 1999). En este caso, las posiciones perpendiculares del ácido acético y del glicerol sugieren que ambos parámetros no están relacionados, posiblemente por la corta longitud de la flecha correspondiente al glicerol, ya que este parámetro no es capaz de agrupar las cepas del mismo modo.



**Figura 18.** Análisis fenómico global de las cepas de laboratorio y las cepas vínicas en condiciones de vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de todos los parámetros cinéticos y enológicos determinados de las cepas analizadas (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not Shaken: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, Shaken: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, Not Shaken:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (Ip), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta Ip (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_dil20 y Fru\_dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

El consumo completo de la glucosa (Glu\_Dil20) y la fructosa (Fru\_Dil20) (concentración de azúcares < 5 g/L) presente en el mosto inicial junto con la liberación de CO<sub>2</sub> esperada indican que todas las cepas son capaces de finalizar la fermentación (datos no mostrados) aunque los tiempos de liberación de CO<sub>2</sub> (t35-lp, t50-lp y t80-lp) son mayores para las cepas de laboratorio (parámetro t50-lp mostrado en panel B de la Figura 19). En la Figura 19 se muestran algunos de los parámetros que mostraron diferencias interesantes: (A) los valores promedio de la fase de latencia (Ip), (B) el tiempo para liberar el 50 % del CO<sub>2</sub>max, descontando la duración de la fase de latencia Ip (t50-lp), (C) el glicerol y (D) el piruvato, con sus respectivas desviaciones típicas. Para cada parámetro, se dan los datos de las 8 cepas analizadas, en el siguiente orden: BQS252, BY4742, BY4743, C9, CSM, DV10, EC1118 y M2, y en cada una de las condiciones de crecimiento ensayadas, en el siguiente orden: sin agitación y con baja concentración de nitrógeno (NS:Low), sin agitación y con concentración de nitrógeno normal (NS:Normal), agitación y con concentración de nitrógeno normal (S:Normal). En el panel A se observa cómo las cepas de laboratorio (tres primeras barras en cada una de las condiciones) presentan una

fase de latencia mayor que las cepas vínicas. Para las cinco cepas vínicas (barras 4 a 8) se observa una cierta tendencia al aumento de la  $I_p$  en condiciones de agitación (tercera condición) sugiriendo que el oxígeno juega un papel negativo en la adaptación de las cepas vínicas a las condiciones adversas de fermentación alcohólica del mosto de uva. Sin embargo, la cepa diploide BY4743 presenta en condiciones de agitación una fase de latencia menor que en las demás condiciones analizadas e incluso menor a su respectiva cepa haploide BY4742. La cepa BQS252 presenta una  $I_p$  intermedia entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio BY4742 y BY4743. Respecto al tiempo necesario para liberar el 50 % del  $CO_2$  teórico,  $t_{50-I_p}$  (panel B), las diferencias entre las cepas vínicas y las de laboratorio se reducen en condiciones de agitación (S:Normal). A destacar el mayor  $t_{50-I_p}$  pero menor fase de latencia de la cepa BY4743 respecto a BY4742 en condiciones de agitación. La diferencia entre ambas es que BY4742 es una cepa haploide y BY4743 es una cepa diploide obtenida a partir de BY4742 y BY4741. La eficiencia del transporte de solutos viene determinada por la relación superficie/volumen por lo que células más grandes presentan una relación superficie/volumen menor y son menos eficientes en el transporte (Turner et al., 2012). Sin embargo, no se observa ninguna diferencia entre la cepa vínica haploide C9 y las demás cepas vínicas diploides. En la cepa BY4743, las auxotrofías para *MET15* y *LYS2* están complementadas, por lo que alguno de estos aminoácidos puede resultar clave para este parámetro. Respecto a las condiciones analizadas, se observa un mayor  $t_{50-I_p}$  en condiciones de baja concentración de nitrógeno (primera condición, panel B) indicando que esa limitación ralentiza la fermentación alcohólica, aunque no influye en la fase de latencia (panel A), donde no se observan diferencias entre concentración de nitrógeno normal (segunda condición) y baja (primera condición).

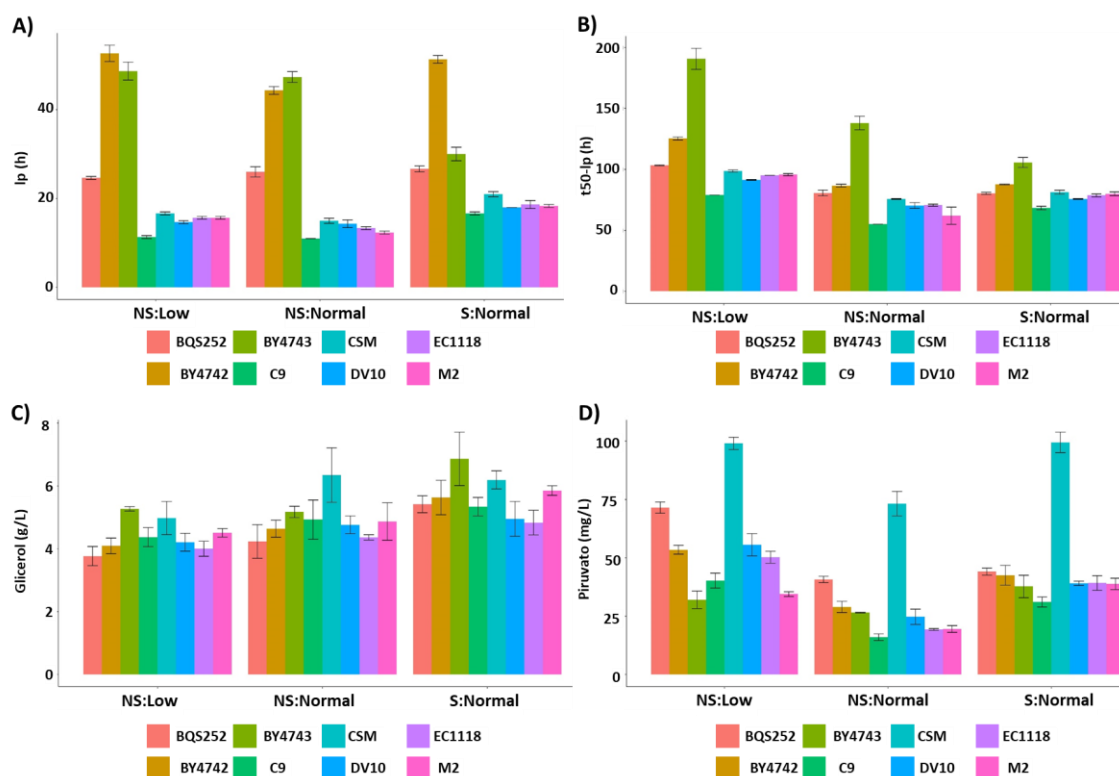
Ni el glicerol ni el piruvato (Figura 19, paneles C y D, respectivamente) son metabolitos que permitan discernir entre cepas vínicas y cepas de laboratorio ya que no se observan diferencias entre ambos tipos de cepas. En condiciones de baja concentración de nitrógeno la acumulación de glicerol en el medio se ve reducida (panel C, primera condición) mientras que en condiciones de agitación aumenta (panel C, tercera condición), lo que sugiere que este metabolito es sensible tanto a la cantidad de nitrógeno como a la agitación. De especial mención es la cepa CSM, que presenta unos niveles de glicerol elevados que coinciden con una mayor acumulación de piruvato, que sugieren elevada eficiencia glicolítica pero baja eficiencia de conversión de piruvato en etanol, lo que activaría la lanzadera del glicerol. No se observan diferencias entre cepas vínicas y cepas de laboratorio en la determinación de ácido málico y ácido acético (datos no mostrados).

Los análisis del crecimiento en medios con diferentes características nutricionales descritos en el apartado 1.3 de este capítulo mostraron que los fenotipos de la cepa EC1118 y DV10 eran muy similares al igual que los de las cepas M2 y CSM entre sí (Figura 14 y Figura 16). Los resultados del análisis fenómico también muestran que los parámetros cinéticos y enológicos de las cepas EC1118 y DV10 son muy similares. A excepción de la concentración de glicerol y piruvato, los demás parámetros de las cepas M2 y CSM también son muy similares. Según las especificaciones comerciales ([www.lallemandwine.com/en/australia/products/catalogue/wine-yeasts/25/enoferm-m2/](http://www.lallemandwine.com/en/australia/products/catalogue/wine-yeasts/25/enoferm-m2/)), la cepa M2 mantiene la acidez inicial del mosto como consecuencia de su reducción en el consumo de ácido málico y succínico. Sin embargo, en la condición NS:Normal, la cual se asemeja bastante a las condiciones industriales de vinificación, la cepa M2 presenta una concentración de ácido málico incluso menor que las cepas EC1118 y DV10 (datos no mostrados). Las cepas M2 y sobre todo CSM tienden a producir más glicerol que EC1118 y DV10 (Figura 19 panel C). Sin embargo, CSM produce más piruvato (Figura 19



panel D) que el resto (aunque las diferencias son sutiles) por lo que no puede establecerse un patrón común en lo que respecta al metabolismo del carbono entre estas cepas.

Aunque los análisis fenómicos realizados sugieren que las cepas analizadas no producen grandes diferencias en parámetros enológicos, sí que detectan diferencias significativas en la capacidad de adaptación inicial al mosto y en la eficiencia fermentativa, parámetros cinéticos fundamentales para la valoración de la adecuación tecnológica de las cepas vínicas e indicadores de posibles diferencias en la señalización y utilización de nutrientes.



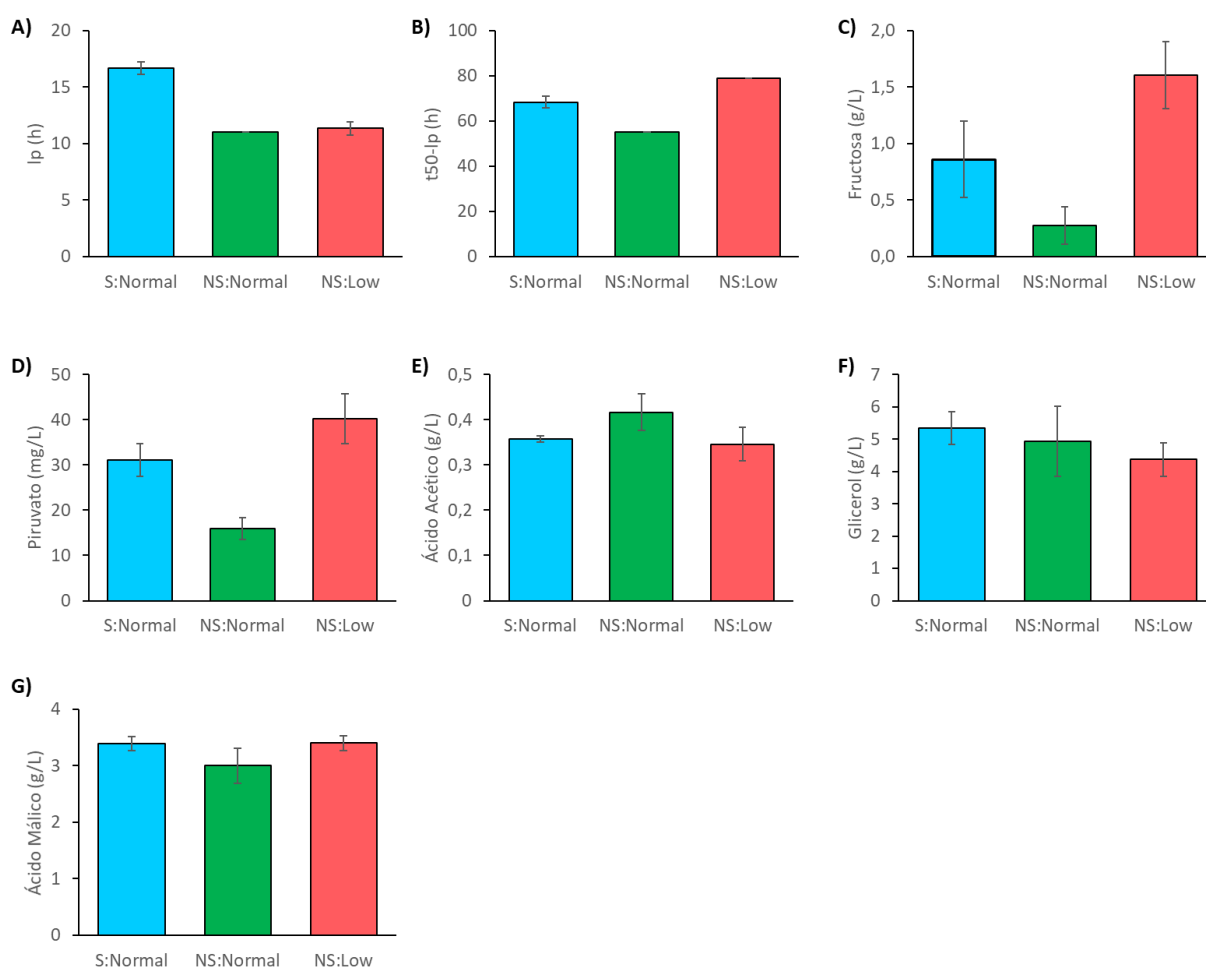
**Figura 19.** Análisis de los parámetros cinéticos y enológicos de cepas vínicas y cepas de laboratorio a lo largo de la vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Efecto las cepas analizadas en: la fase de latencia ( $I_p$ ) (A), el tiempo en liberar el 50 % de  $CO_2$  menos el tiempo de la fase de latencia ( $t_{50-lp}$ ) (B), acumulación de glicerol en el medio (g/L) (C) y acumulación de piruvato en el medio (mg/L) (D). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

### 1.5. Análisis fenómico: efecto de las condiciones en la vinificación

El análisis de múltiples variables durante la vinificación permite comparar diversas cepas y evaluar el efecto de diversas mutaciones (Capítulo 2). No obstante, como es de prever, las diferentes condiciones de fermentación (agitación y nitrógeno), afectan de manera acusada los parámetros enológicos. Este apartado pretende analizar los parámetros con mayor variabilidad en la cepa vínica haploide C9 (Figura 20), pues es la utilizada para el análisis de las modificaciones genéticas en apartados posteriores. Tanto la agitación (S:Normal) como la baja concentración de nitrógeno (NS:Low) son dos condiciones que afectan de manera muy similar a los parámetros tanto cinéticos como enológicos determinados. La condición S:Normal es más parecida a la producida en condiciones de laboratorio mientras que la NS:Normal a las condiciones de vinificación. Respecto a los parámetros cinéticos, se observa una mayor fase de



latencia (panel A) y un mayor tiempo de liberación de CO<sub>2</sub> (panel B) (y, por tanto, menor velocidad de producción) tanto en agitación (barra azul) como en bajo nitrógeno (barra roja). La fase de latencia también se ve modificada en mayor medida en agitación que en baja concentración de nitrógeno. Ese aumento observado en S:Normal puede ser como consecuencia de que la cepa vínica utilizada (C9) está más adaptada a las condiciones de fermentación alcohólica utilizada en la industria, donde no se produce agitación. Este resultado estaría en concordancia con la pequeña diferencia observada en la fase de latencia en NS:Low, la cepa estaría más adaptada al ayuno de nitrógeno. No se observan diferencias respecto a la glucosa residual (datos no mostrados) pero sí respecto a la fructosa (panel C), donde la baja concentración de nitrógeno impide un consumo total de la misma. Ni el glicerol (panel F) ni el ácido málico (panel G) se ven influenciados por la agitación o la concentración de nitrógeno. Sin embargo, sí que se observa una cierta acumulación de piruvato (panel D) en agitación o bajo nitrógeno, observándose una mayor acumulación en esta última condición. Respecto al ácido acético (panel E), los resultados se contraponen a los del piruvato, la condición NS:Normal (barra verde) presenta una mayor acumulación de ácido acético que las otras dos condiciones (S:Normal y NS:Low). En definitiva, salvo la fase de latencia donde la agitación aumenta dicho parámetro pero la falta de nitrógeno no lo modifica, los demás parámetros como el piruvato, la fructosa, el ácido acético y el t50-lp se ven modificados en las condiciones de agitación y baja concentración de nitrógeno en la misma dirección.



**Figura 20.** Implicación de la agitación y la concentración de nitrógeno en los parámetros cinéticos y enológicos en la cepa vínica haploide C9 determinados de la fermentación alcohólica del mosto Sauvignon Blanc. Fase de latencia (lp, h) (A), tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub>

menos la fase de latencia ( $t_{50-lp}$ , h) (B), fructosa residual (g/L) (C), piruvato (mg/L) (D), ácido acético (g/L) (E), glicerol (g/L) (F) y ácido málico (g/L) (G) en la cepa vínica C9. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:Shaken, azul) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken, rojo). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

## 2. Efecto del herbicida glufosinato de amonio en vinificación

En el estudio del efecto de inhibidores químicos de la síntesis de aminoácidos, descrito en el apartado 1.2 de este capítulo, se observó que dichos inhibidores son capaces de influir en el crecimiento de *S. cerevisiae*. Dado que algunos productos utilizados en tratamientos agrícolas, como el glufosinato de amonio, pueden persistir y estar presentes en el mosto y también son considerados inhibidores, se investigó a continuación su efecto durante la fermentación y su impacto en el metabolismo de la levadura. El GA, también conocido como fosfinotricina, es un análogo estructural del glutamato capaz de inhibir a la glutamina sintetasa, enzima que cataliza la conversión del glutamato y amonio en glutamina. El GA es el principio activo de un gran número de herbicidas comerciales, como Finale®, BASTA® y Kibosch®. En plantas, la inhibición de la glutamina sintetasa causa una acumulación de amonio y disminuye los niveles de glutamina, lo que inhibe la fotorespiración y la fotosíntesis (Wild y Wendler, 1993). Shimizu et al., (2008) demostraron que un mutante deficiente en *GLN1*, que codifica la glutamina sintetasa en levadura, afecta a la integridad de la pared celular, lo que sugiere que su inhibición podría causar un efecto similar.

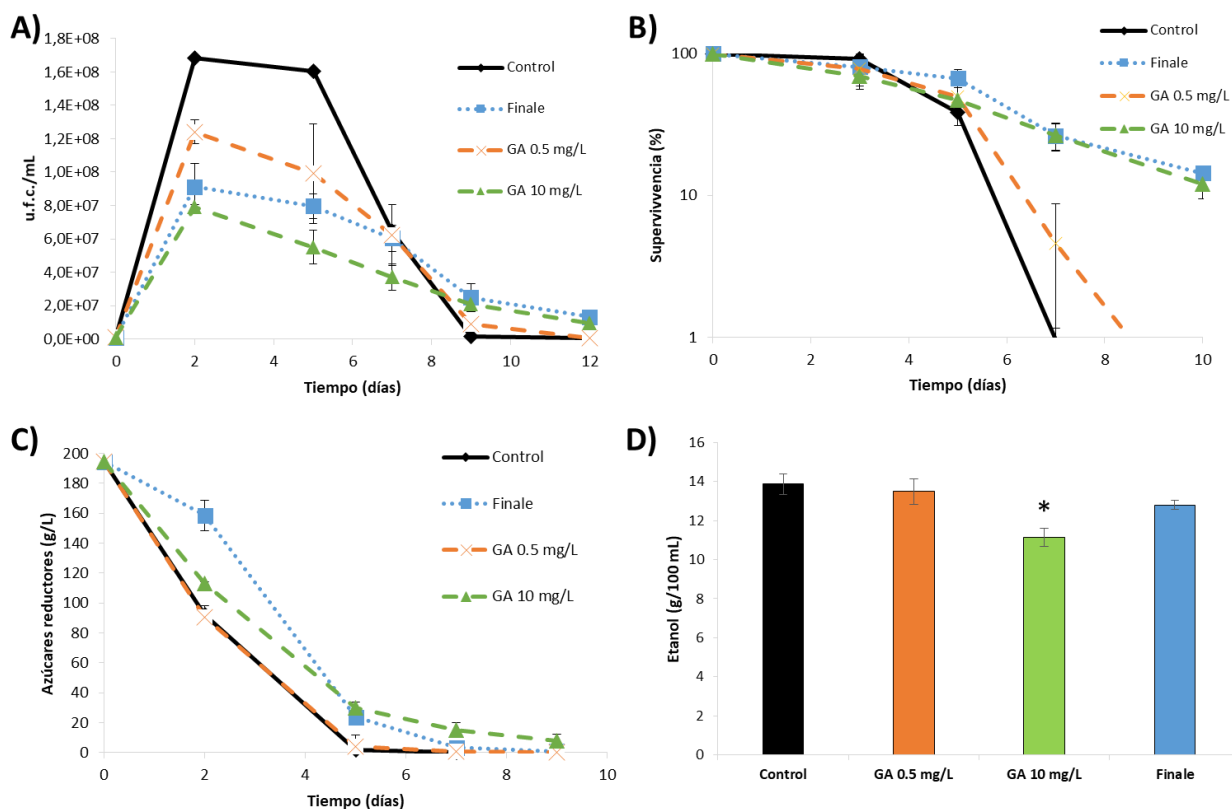
Además, debido a su modo de acción puede utilizarse como herramienta para entender la fisiología de la levadura en condiciones industriales, de forma equivalente a la L-metionina sulfoximina, otro inhibidor de la glutamina sintetasa que también causa un ayuno de glutamina desencadenando la inhibición parcial de la ruta TOR (Crespo et al., 2002) y la activación del control general de aminoácidos (GAAC). Por ello, se planteó el estudio del efecto del GA durante la fermentación y su impacto en el metabolismo de la levadura.

### 2.1. Impacto del glufosinato de amonio en la fermentación del mosto

El estudio se realizó en vinificaciones con la cepa de *S. cerevisiae* EC1118 en mosto natural de la variedad tinta Bobal en presencia de GA (10 mg/L), pues a dicha concentración la integridad de la pared se ve afectada (Shimizu et al., 2008), y una concentración menor, de 0.5 mg/L, más próxima a la concentración residual presente en uva y similar al nivel máximo permitido (mg/kg) por la UE en 2015. En 2016, el nivel máximo permitido disminuyó hasta 0.15 mg/kg. También se utilizó el herbicida comercial Finale®, que presenta un 15 % de GA, a una concentración de GA final de 10 mg/L, con el fin de comprobar si sus efectos son debidos exclusivamente al principio activo.

Tal y como se observa en el panel A de la Figura 21, el GA afecta de forma directamente proporcional a su concentración, al crecimiento de *S. cerevisiae*. La concentración más alta de GA reduce a la mitad el número de células obtenidas en el máximo de crecimiento (2 días) respecto a la ausencia del inhibidor. Se observa una reducción similar en presencia de Finale, a la misma concentración de GA (líneas verde y azul). La concentración de 0.5 mg/L de GA también reduce el crecimiento pero en menor medida. El fenotipo observado con la adición del herbicida comercial Finale® es ligeramente inferior al observado con la mayor

concentración. La ligera diferencia en el crecimiento puede deberse a una menor concentración del principio activo real como consecuencia del almacenamiento o una incorrecta cuantificación del GA en el herbicida. Los fenotipos observados, tanto en presencia de GA como de Finale®, indican la importancia de la glutamina sintetasa en la fermentación alcohólica del mosto de uva. Aunque el mosto presenta los aminoácidos requeridos para el crecimiento de *S. cerevisiae*, incluyendo la glutamina, la inhibición de un paso clave en el metabolismo del nitrógeno posiblemente dificulta la correcta transformación de unas fuentes de nitrógeno en otras.



**Figura 21.** Impacto del glufosinato de amonio en la fermentación alcohólica del mosto de uva variedad Bobal llevada a cabo por la cepa vínica EC1118. Curvas de crecimiento en presencia del herbicida comercial Finale® y GA a diferentes concentraciones. Se representan las unidades formadoras de colonia por mL a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del panel anterior (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) (C). Concentración de etanol (g/100 mL) al finalizar la fermentación alcohólica (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias (\* P-valor  $\leq 0.05$ ).

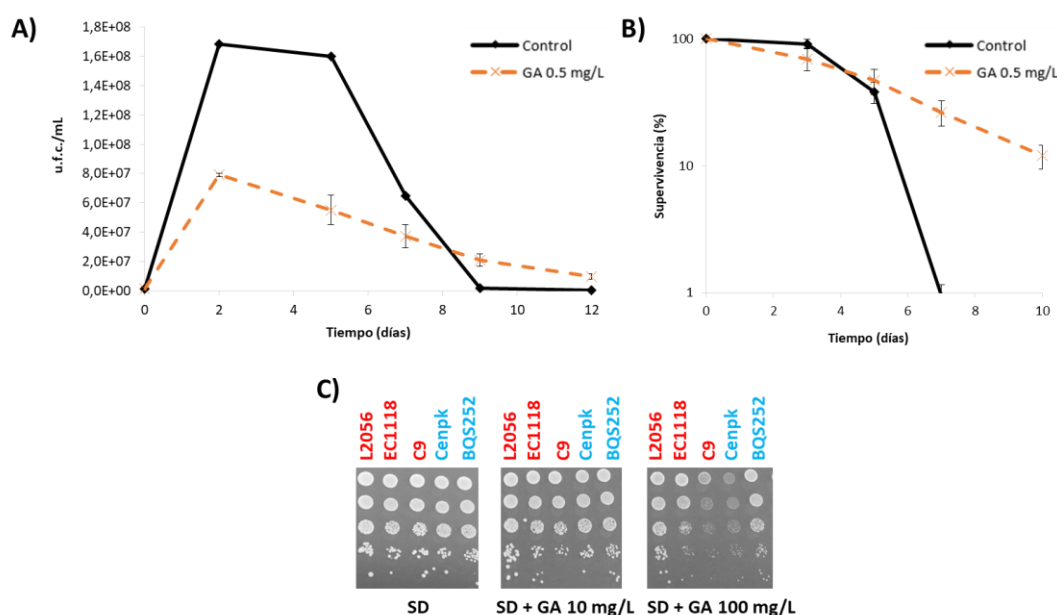
En la Figura 21, panel B, se representa la supervivencia en función de los días de fermentación, tomando el valor de máximo crecimiento (día 2) como 100 % de viabilidad, mostrando así la longevidad cronológica. Aunque el GA inhibe el crecimiento se observa que aumenta la LC de forma significativa, al menos en las concentraciones más elevadas. Ese aumento de LC podría producirse como consecuencia de una menor actividad metabólica, ya que es conocido que la restricción dietaria causa la extensión de la longevidad. Este efecto es común a los compuestos químicos que causan ayuno y/o inhiben las rutas de señalización de nutrientes. Por ejemplo, la rapamicina y el MSX extienden la LC (Orozco et al., 2012c), y el GA parece tener un mecanismo similar de actuación, convirtiéndose en una potente herramienta para extender la longevidad de las levaduras industriales en condiciones de vinificación. Para

analizar la evolución de la fermentación vínica, se estudió la cinética de consumo de los azúcares a lo largo de la vinificación, Figura 21, panel C, observándose su consumo completo en todas las condiciones. La adición de GA a 10 mg/L o una concentración equivalente en forma de herbicida Finale®, produce un retraso de 2 días en el tiempo necesario para consumir todos los azúcares del mosto, respecto de las vinificaciones en ausencia de GA y con GA 0.5 mg/L. Cabe destacar que una concentración de GA de 0.5 mg/L sí que afecta al crecimiento, tal y como se observa en el panel A, pero no a la cinética de fermentación (panel C) ya que la fermentación finaliza a 9 días, igual que la fermentación control. Esto sugiere que el GA afecta fundamentalmente a la proliferación y que sólo cuando ésta se ve fuertemente afectada se observan efectos en la cinética de fermentación, requiriéndose tiempos más largos para completar el consumo de azúcares. Finalmente se determinó la concentración de etanol obtenida al finalizar la fermentación, Figura 21 panel D. En este caso, la adición de GA a 10 mg/L y el herbicida Finale® no son condiciones equivalentes. Se observan únicamente diferencias significativas en la fermentación en presencia de GA 10 mg/L, donde se obtuvo una menor concentración de etanol, lo que confirma que una alta concentración de GA tiene efecto también en el metabolismo de los azúcares y en la capacidad fermentativa.

## 2.2. Determinantes genéticos de la sensibilidad a glufosinato de amonio

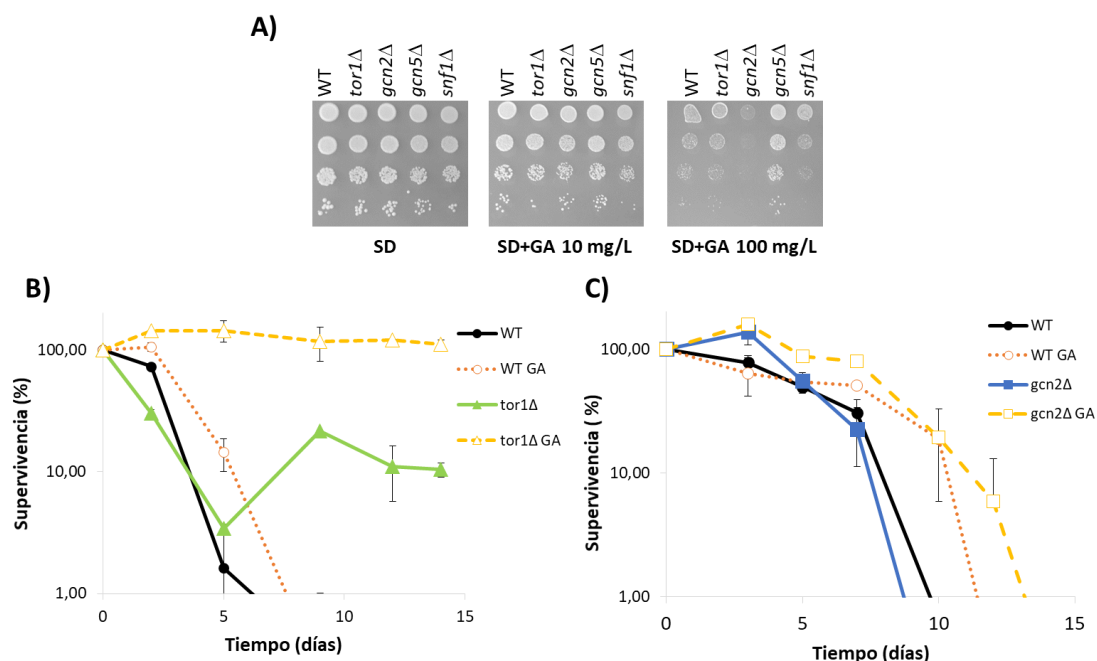
Con el fin de estudiar los determinantes genéticos de la sensibilidad a GA se construyeron mutantes de las rutas de señalización de nutrientes TORC1, GAAC y SNF1, y también del complejo SAGA en la cepa vínica haploide C9 por la facilidad de obtención de mutantes de delección. Previamente se comprobó que el fenotipo del GA observado en la cepa EC1118 (Figura 21) se mantiene en C9 (Figura 22, paneles A y B), usando la menor concentración de GA ensayada, y también una concentración 10 veces superior a la usada en experimentos anteriores, para los ensayos en placa (panel C).

El GA tiene el mismo efecto sobre el fenotipo de la cepa C9 que sobre la cepa EC1118 puesto que, tal y como se muestra en la Figura 22 panel A, también disminuye su crecimiento casi a la mitad de unidades formadoras de colonia por mL y también se produce un aumento de la LC, panel B. Dichos fenotipos son más acusados para la misma concentración de GA que los observados para EC1118, lo que sugiere determinantes genéticos para dicha sensibilidad. Se realizaron también goteos en medio mínimo SD en presencia de varias concentraciones de GA con cepas de laboratorio (CEN.PK, BQS252) y con cepas vínicas (L2056, EC1118, C9). Pese a que se observan diferencias en la resistencia frente al GA a su más alta concentración, siendo C9 y CEN.PK más sensibles que el resto (Figura 22 panel C), la respuesta a dosis menores de GA es la misma en los diferentes fondos genéticos. Por todo ello, se inició el estudio de los mutantes con la cepa C9.



**Figura 22.** Comparación del impacto del glufosinato de amonio en la fermentación alcohólica del mosto de uva llevada a cabo por la cepa haploide C9. Curvas de crecimiento en presencia del inhibidor GA (0.5 mg/L) y en ausencia del mismo. Se representan las unidades formadoras de colonia (u.f.c.) por mL a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del panel anterior (B). Goteos en placa en medio mínimo SD con diferentes concentraciones de GA de diversas cepas (C). Los experimentos de los paneles A y B se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Azul: cepas de laboratorio Rojo: cepas vínicas.

La mayor o menor sensibilidad de determinados mutantes de delección puede indicarnos qué ruta está implicada en la respuesta frente al GA. Por ello, se analizó el crecimiento en medio mínimo SD en ausencia de aminoácidos de los mutantes *tor1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn5Δ* y *snf1Δ* mediante goteos en placas con GA a diferentes concentraciones (Figura 23 panel A). Al inhibir la glutamina sintetasa y causar ayuno de glutamina, la cepa silvestre ya presenta defectos de crecimiento. El mutante *gcn2Δ* muestra una elevada sensibilidad al GA, no observándose apenas crecimiento en la concentración más alta de GA. La proteína quinasa dispara el GAAC e induce las enzimas necesarias para el uso de fuentes de nitrógeno no tan preferidas. En condiciones de inhibición de la glutamina sintetasa por acción del GA, la disponibilidad de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno no es capaz de sustentar el crecimiento del mutante *gcn2Δ*. La delección de los genes *TOR1* y *SNF1* no aumenta la sensibilidad a GA, aunque el efecto sobre la ruta TORC1 no puede descartarse ya que la deficiencia de Tor1p puede suplirse al menos parcialmente por Tor2p. El mutante *gcn5Δ* presenta una mayor resistencia a GA que la cepa silvestre. Gcn5p es una histona acetiltransferasa nuclear perteneciente al complejo SAGA, implicado en regulación transcripcional a través de mecanismos de remodelación de la cromatina que pueden afectar a los niveles de expresión de muchos genes, muchos de ellos de respuesta a estrés y de respuesta retrógrada. La ausencia de Gcn5p podría generar perfiles de expresión capaces de compensar la inhibición de la glutamina sintetasa en presencia de GA. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que el mutante *gcn5Δ* presenta una LC mayor que la cepa silvestre en condiciones de vinificación mientras que su LC se ve disminuida en medio mínimo (Orozco et al., 2012c), demostrando que el papel de esta histona acetil transferasa es dependiente de medio y condiciones de crecimiento, como también sugieren los resultados en presencia de GA.

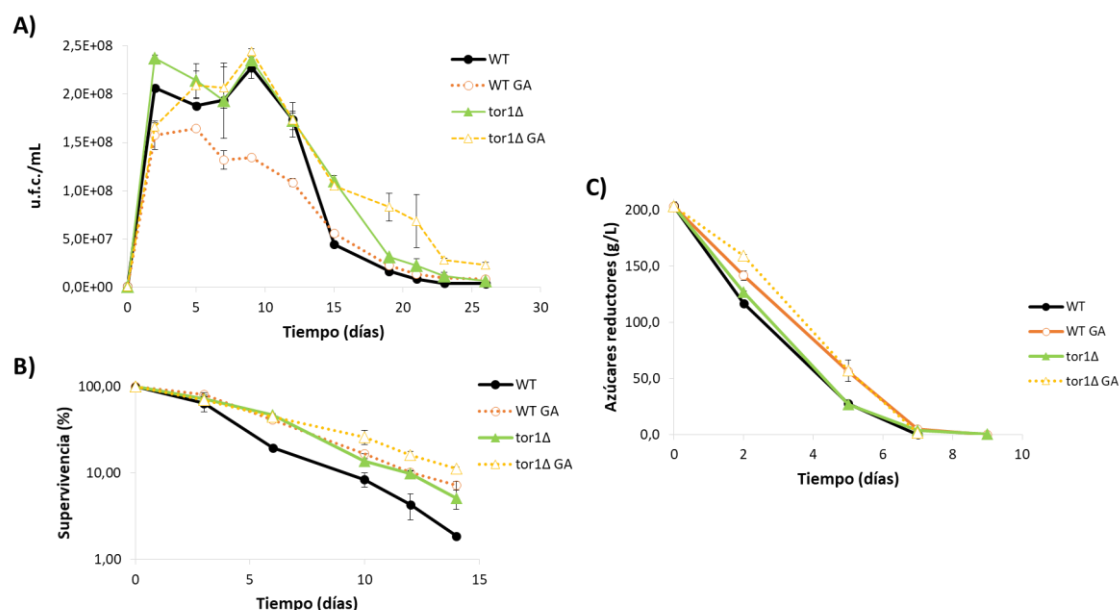


**Figura 23.** Efecto del GA en mutantes de delección de proteínas que forman parte de las rutas de señalización de nutrientes TORC1, GAAC y SNF1. Goteos en placa en medio mínimo SD de los mutantes *tor1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn5Δ* y *snf1Δ* en la cepa C9 (A). Curva de longevidad cronológica en medio mínimo completo SC obtenida a partir de las u.f.c./mL del día 3 como máximo de crecimiento, para la cepa silvestre y el mutante *tor1Δ*, en presencia y ausencia de GA (B). Curva de longevidad cronológica en medio mínimo completo SC obtenida a partir de las u.f.c./mL del día 3 como máximo de crecimiento, para la cepa silvestre y el mutante *gcn2Δ*, en presencia y ausencia de GA (C). Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas.

A continuación, se realizó un experimento de envejecimiento cronológico de los mutantes *tor1Δ* y *gcn2Δ* para analizar las diferencias en la LC en medio mínimo completo SC, medio estándar para realizar experimentos de envejecimiento, que contiene aminoácidos y que permite evitar cualquier posible interferencia causada por una baja concentración de nitrógeno. El experimento se muestra en los paneles B y C de la Figura 23 donde se muestra la disminución de la viabilidad a partir del día 3 de fermentación. Un mutante de delección en *TOR1* presenta una mayor longevidad, tanto cronológica como replicativa (Bonawitz et al., 2007; Kaeberlein et al., 2005; Powers et al., 2006), resultados que se corroboran en la Figura 23, panel B. El GA también extiende la LC, pero en menor medida. El aumento todavía mayor de la LC en el mutante *tor1Δ* en presencia de GA indica un efecto aditivo, lo que sugiere que existen otros mecanismos, a parte del complejo TORC1, que controlan la LC y sobre lo que puede actuar el GA. No hay diferencias significativas en la LC en el mutante *gcn2Δ* en las condiciones analizadas lo que indica que la ausencia de la proteína quinasa Gcn2p, como cabría esperar, parece no ser tan relevante en condiciones ricas en aminoácidos como en ausencia de los mismos.

Aunque la determinación de la LC puede realizarse tanto en condiciones de envejecimiento como en condiciones de vinificación, las condiciones analizadas no son las mismas. Por ello, se analizó el crecimiento y la LC de los mutantes *tor1Δ* y *gcn2Δ* en condiciones de vinificación en mosto sintético (MS300), Figura 24 y Figura 25 respectivamente. El GA afecta también al crecimiento en condiciones de vinificación en mosto sintético puesto que se obtiene menos densidad celular que en ausencia del inhibidor (Figura 25 panel A),

extendiendo además la longevidad (Figura 25 panel B). El efecto del GA en mosto sintético es muy similar al obtenido en mosto natural (Figura 22). En ambos casos, el GA disminuye el crecimiento afectando a la densidad celular y alargando la LC.

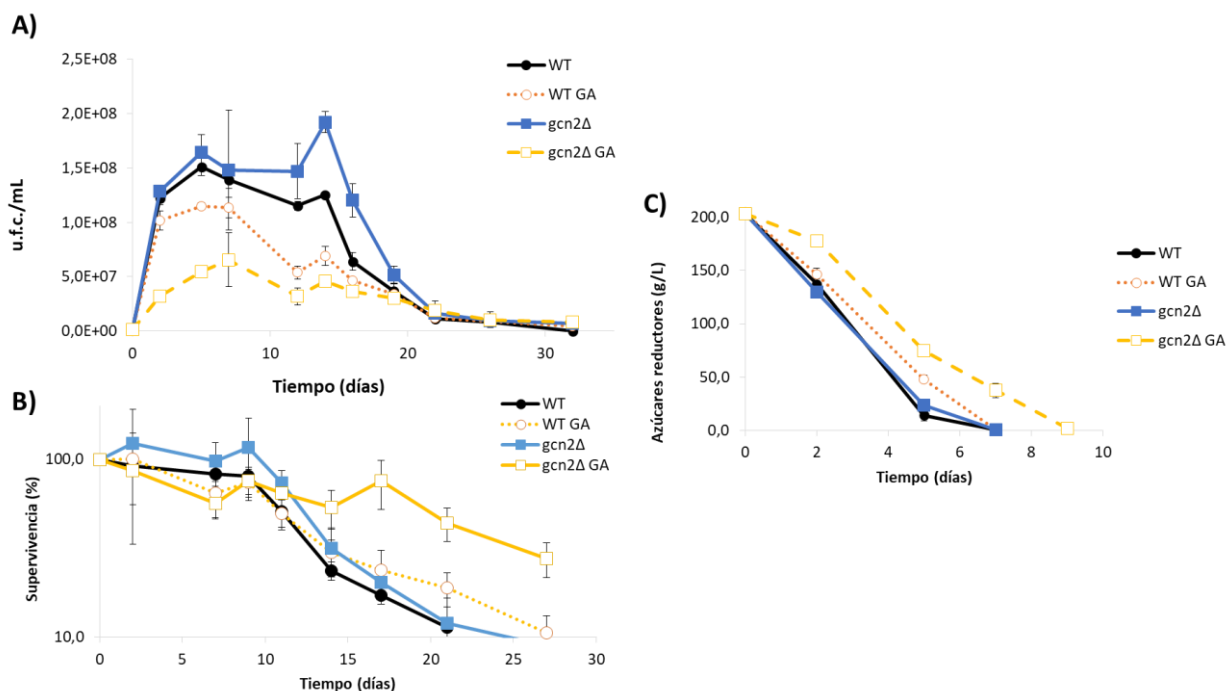


**Figura 24.** Efecto de la delección del gen *TOR1* en condiciones de vinificación en mosto sintético MS300 en presencia de glufosinato de amonio. Curvas de crecimiento en presencia de GA (10 mg/L) de la cepa vínica C9 y el mutante *tor1Δ*. Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del panel anterior. Se determinó el tiempo 5 días como el 100 % de células viables (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El mutante *tor1Δ* no tiene un defecto significativo de crecimiento y extiende ligeramente la longevidad. La delección de *TOR1* en presencia de GA retrasa el crecimiento aunque finalmente se obtiene una densidad celular muy similar respecto a la cepa silvestre y al mutante *tor1Δ*, y mayor que la cepa silvestre tratada con GA. Esto indica que la mutación de *TOR1* suprime el efecto de GA en el crecimiento, sugiriendo que el punto de acción de GA respecto al crecimiento se encuentra por arriba de la quinasa *TOR1*. El aumento de la LC en el mutante *tor1Δ* en presencia de GA respecto del mutante en ausencia del inhibidor indica que el GA actúa independientemente de *TOR1* afectando así al crecimiento y a la longevidad; sin embargo, el consumo de azúcares reductores no se ve afectado. El incremento de la LC en *tor1Δ* GA, también en condiciones de vinificación con mosto natural, reitera que el GA afecta a la longevidad por mecanismos independientes de *TOR1*.

La delección de la proteína quinasa Gcn2p no afecta significativamente al crecimiento, tal y como se observa en el panel A de la Figura 25. La adición de GA reprime considerablemente el crecimiento de la cepa silvestre y más aún del mutante, efecto también observado en el panel A de la Figura 23. Al observarse un efecto aditivo entre el GA y la ausencia de Gcn2p (Figura 25), puede proponerse que el GA ejerce su acción a través de otras dianas no implicadas en el control general de aminoácidos, ruta de la cual forma parte Gcn2p. El retraso en el consumo de azúcares reductores del mutante *gcn2Δ* en presencia de GA puede deberse a la inhibición del crecimiento observada y, por tanto, a un menor número de células, puesto que es capaz de

finalizar la fermentación. La delección de *GCN2* no afecta al crecimiento en condiciones de vinificación; sin embargo, en presencia de GA se produce un aumento de la LC, fenotipo no observado en los goteos realizados en la Figura 22. Ello indica que la función de Gcn2p, en presencia de GA, se hace más visible en términos de longevidad.



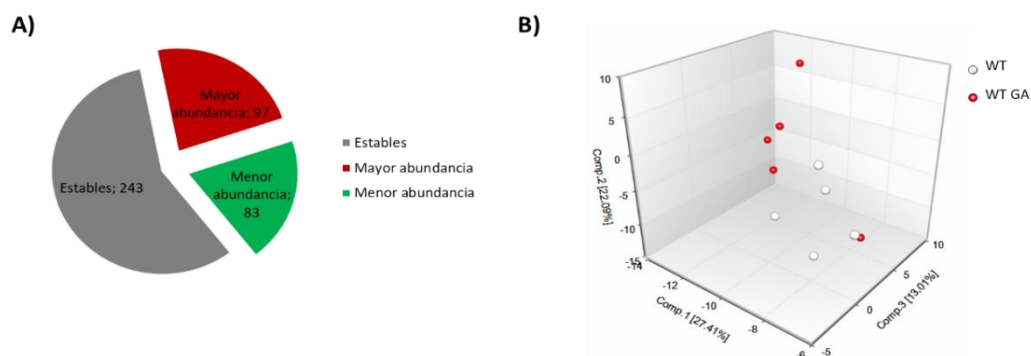
**Figura 25.** Efecto de la delección de *GCN2* en presencia de glufosinato de amonio en condiciones de vinificación en mosto sintético MS300. Curvas de crecimiento en presencia de GA (10 mg/L) de la cepa vínica C9 y el mutante *gcn2Δ* (A). Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación. Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del panel anterior (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 2.3. Impacto del glufosinato de amonio en el metabolismo durante la vinificación

Demostrado el efecto del GA sobre la LC y la fermentación y su compleja y no dilucidada relación con diferentes rutas de señalización, se planteó un estudio metabolómico comparado de la cepa vínica silvestre C9 en presencia y ausencia de GA (10 mg/L) (Vallejo et al., 2017b). Se analizaron los metabolitos intracelulares a partir de muestras de vinificación en mosto sintético MS300 en fase estacionaria y con una concentración de azúcares de aproximadamente 50 g/L. Las muestras se recogieron por quintuplicado.

De los 423 metabolitos detectados, 180 metabolitos ( $p \leq 0.05$ ) variaron sus niveles respecto de la cepa silvestre en ausencia de GA (condición control). De esos 180 metabolitos, 97 se encontraron en mayor abundancia en presencia de GA y 83 en menor abundancia, Figura 26 panel A. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en el que se muestra que los perfiles de cada una de las condiciones son diferentes y las 5 réplicas de cada una de esas condiciones se agrupan, Figura 26 panel B.





**Figura 26.** Metabolitos afectados por el glutosinato de amonio. Relación de los metabolitos cuyos niveles han variado o se han mantenido estables con un estadístico  $p \leq 0.05$  debido al tratamiento con GA respecto de la condición control (A). Análisis de componentes principales (PCA) de los quintuplicados de las muestras analizadas para el metaboloma (B).

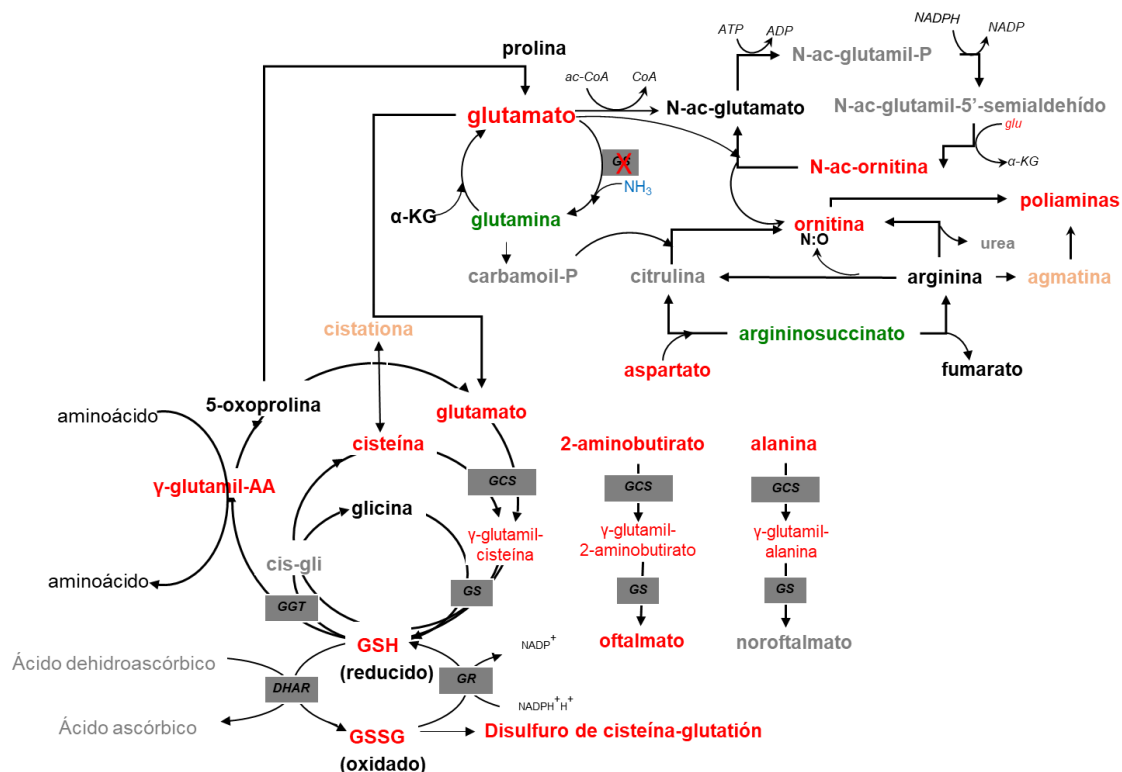
La actividad de la glutamina sintetasa es de gran importancia en levaduras puesto que permite asimilar el glutamato y el amonio para dar lugar al aminoácido glutamina, una de las fuentes preferidas de nitrógeno por la levadura ya que, tal y como se ha comentado en la Introducción (apartado 6.4), en ayuno de nitrógeno dicho aminoácido se degrada para poder liberar amonio y suplir las deficiencias de nitrógeno. Ello indica que, al tener inhibida la glutamina sintetasa debido al GA, se reduce la síntesis de aminoácidos a partir de glutamato. El tratamiento con GA disminuye los niveles de glutamina y asparagina, pero aumenta la mayoría de los aminoácidos proteínogénicos (Figura 27), posiblemente por la reducción de su catabolismo, ya que los niveles de purinas y productos procedentes del catabolismo de aminoácidos se encuentran reducidos. Esto indica la activación de un mecanismo compensatorio de ahorro en el uso de aminoácidos.

Los niveles de metabolitos que forman parte de la glicólisis no se ven afectados y el consumo de azúcares no se ve alterado en presencia de GA (datos no mostrados). Sin embargo, sí se observa un menor crecimiento en presencia de GA, Figura 22 panel A. La disminución de los niveles de purinas no podría explicar por completo dicho déficit de crecimiento.

El metabolismo del glutamato se ve afectado debido a la inhibición de la glutamina sintetasa producida por el GA, Figura 27. El glutamato puede convertirse en N-acetilglutamato para dar lugar a ornitina, que junto con la N- $\alpha$ -acetilornitina, son los compuestos que más se acumulan en la cepa tratada con GA respecto de la condición control. Como consecuencia, la putrescina y la N-acetilputrescina se encuentran en niveles elevados ya que son productos de la ornitina. Se trata de poliaminas, moléculas capaces de interaccionar con el DNA, RNA e incluso proteínas debido a las cargas negativas que presentan. La putrescina y la N-acetilputrescina junto con la agmatina y espermidina son las principales poliaminas que se encuentran en niveles elevados en la cepa tratada con GA. La disminución en los niveles de poliaminas se asocia con el envejecimiento por lo que son consideradas moléculas anti-envejecimiento (Eisenberg et al., 2009; Minois et al., 2011) lo que podría explicar el aumento en la LC en presencia de GA.

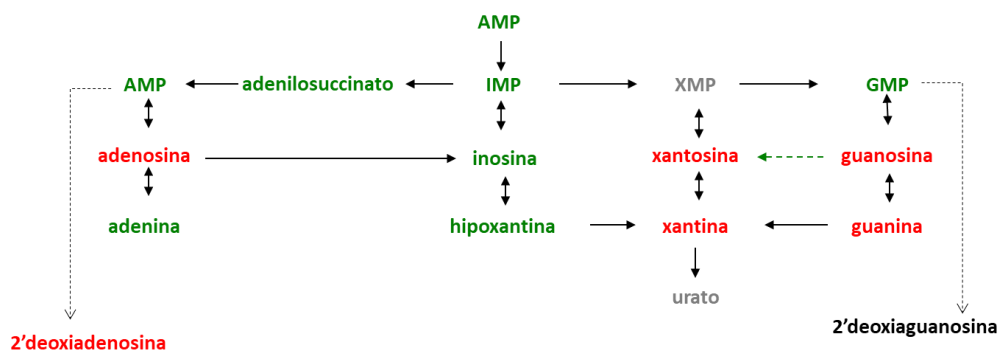
El exceso de glutamato no parece dirigirse a la biosíntesis de aminoácidos puesto que los niveles de prolina, arginina y  $\gamma$ -aminobutirato (aminoácidos derivados del glutamato) no cambian, se mantienen constantes en ambas condiciones analizadas (Figura 27). Todo indica que el exceso de glutamato parece fluir hacia la síntesis de glutatión, tripéptido L- $\gamma$ -glutamyl-L-

cisteinilglicina, implicado en la detoxificación no enzimática de las ROS y cuya síntesis se induce bajo estrés oxidativo. En presencia de GA, los compuestos asociados al ciclo del glutatión se encuentran en niveles más elevados que en la condición control sugiriendo que el tratamiento con GA conlleva un aumento en los niveles de estrés oxidativo.



**Figura 27.** Efecto del glufosinato de amonio en el metabolismo del glutamato en la cepa vítica C9 en estado estacionario durante vinificación en mosto sintético MS300. En rojo y verde se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia, respectivamente, en comparación con la condición control con un estadístico de  $p \leq 0.05$ . En rosa claro se muestran los metabolitos que tienen una mayor abundancia con respecto al control con un estadístico  $p \leq 0.1$ . En negro, los metabolitos cuyos niveles no varían en gris, los no detectados.

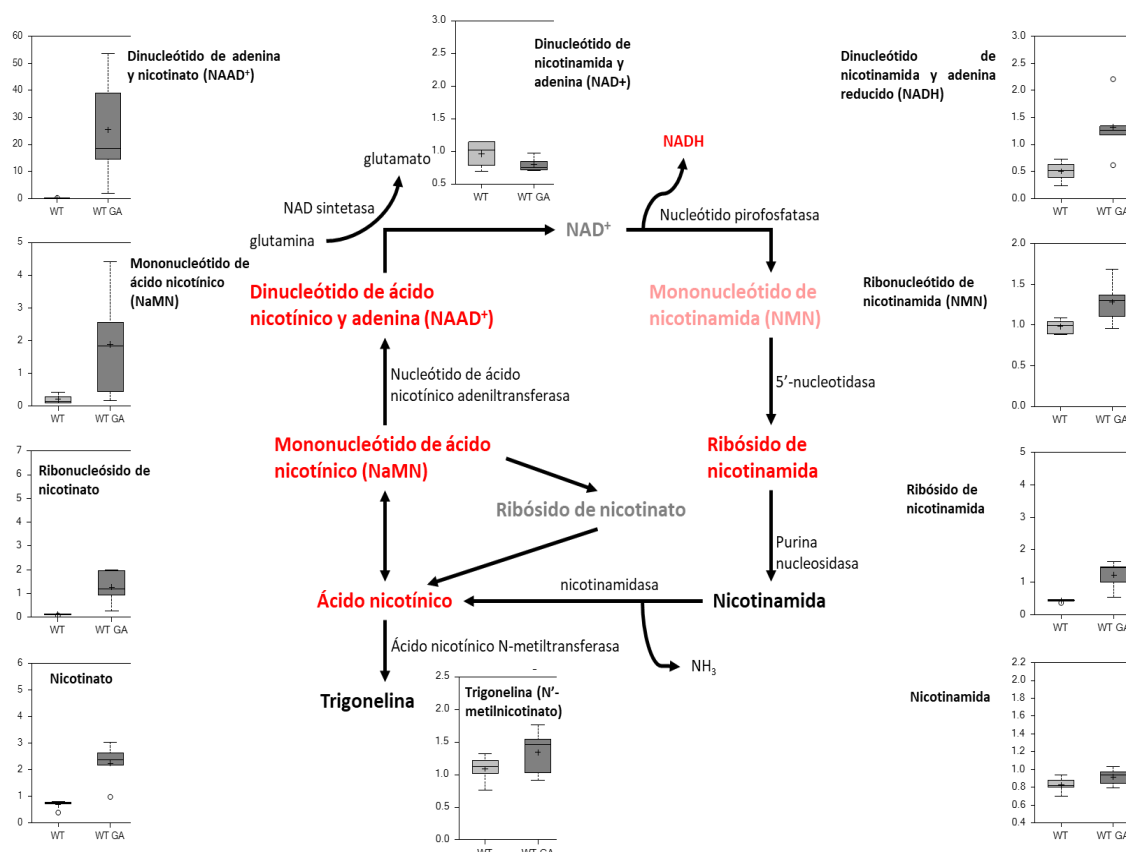
Uno de los cambios más significativos bajo el tratamiento de GA fue una acumulación 50 veces mayor de xantosina, producto de la ruta de recuperación de las purinas, Figura 28. La xantosina puede convertirse en urato con la liberación de amonio. Los altos niveles de xantosina podrían prevenir niveles de amonio elevados, que pueden ser tóxicos en ausencia de la actividad de la glutamina sintetasa.



**Figura 28.** Efecto del glufosinato de amonio en el metabolismo de las purinas en la cepa vínica C9 en estado estacionario durante vinificación en mosto sintético MS300. En rojo y verde se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia, respectivamente, en comparación con la condición control con un estadístico de  $p \leq 0.05$ . En negro, los metabolitos cuyos niveles no varían y en gris, los no detectados.

Otro de los cambios más llamativos fue una acumulación 123 veces mayor del dinucleótido de ácido nicotínico y adenina (NAAD<sup>+</sup>) en la condición con GA, Figura 29. El NAAD<sup>+</sup> es convertido en dinucleótido de nicotinamida y adenina si la glutamina actúa como donador de nitrógeno. Por lo tanto, la acumulación de NAAD<sup>+</sup> indica que la glutamina no puede reemplazarse en la donación del grupo nitrógeno en la síntesis de NAD<sup>+</sup> en respuesta al tratamiento con GA. La acumulación de los precursores de NAAD<sup>+</sup> y de la ruta de recuperación podría explicar el incremento en los niveles de NAAD<sup>+</sup>. El NAD<sup>+</sup> no se encuentra en mayores niveles en presencia del GA; sin embargo, su versión reducida, el NADH se acumula debido al tratamiento con GA. Es posible que el consumo de NAD<sup>+</sup> y, como consecuencia, una acumulación de NADH, se produzca debido a la acción de la sirtuina Sir2p, la cual utiliza NAD<sup>+</sup> como sustrato. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la sirtuina Sir2p extiende la LC en condiciones de laboratorio y la acorta en condiciones de vinificación (Orozco et al., 2012c). Esta menor actividad de Sir2p podría ser una diana adicional e indirecta de GA en lo que respecta a la LC.

En base a los datos mostrados puede concluirse que el glufosinato de amonio es capaz de influir en el crecimiento y en la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* incidiendo en gran parte en su metabolismo. La inhibición de la glutamina sintetasa y el ayuno de nitrógeno causado por la misma aumentan la longevidad cronológica y disminuye la velocidad de consumo de azúcares. Los goteos realizados muestran que el GA dispara el control general de aminoácidos (GAAC) a través de la proteína quinasa Gcn2p, ya que el mutante *gcn2Δ* presenta déficit de crecimiento en presencia de altas dosis de GA (Figura 23, panel A). El GA disminuye los metabolitos asociados con la síntesis de purinas produciendo posiblemente una reducción de la transcripción y causando el menor crecimiento observado tanto en condiciones de vinificación como en condiciones de envejecimiento; sin embargo, los metabolitos asociados a la glicólisis no están afectados. Como consecuencia, el GA parece afectar al crecimiento pero no a la capacidad fermentativa, puesto que es capaz de finalizar la fermentación. La acumulación de metabolitos relacionados con el ciclo del glutatión indicaría que el GA causa niveles elevados de estrés oxidativo. La comparación del número de metabolitos modificados en la cepa silvestre en presencia de GA es menor que en mutantes de delección en proteínas de la ruta TOR o del GAAC (Vallejo et al., 2017a) indicando que el impacto observado en el metabolismo se debe a mecanismos adicionales, o a una inhibición parcial de las rutas anteriormente comentadas.



**Figura 29.** Alteración de la ruta de recuperación de NAD<sup>+</sup> debido al tratamiento con glufosinato de amonio en condiciones de vinificación con MS300 con la cepa vínica C9. En rojo y verde se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia, respectivamente, en comparación con la condición control con un estadístico de  $p \leq 0.05$ . En rosa claro se muestran los metabolitos que tienen una mayor abundancia con respecto al control con un estadístico  $p \leq 0.1$ . En negro, los metabolitos cuyos niveles no varían y en gris, los no detectados.

### 3. Evolución dirigida de cepas vínicas

Tal y como se ha demostrado en el apartado 2 de este capítulo, los inhibidores químicos, y en concreto el glufosinato de amonio, son capaces de modificar el metabolismo de las levaduras vínicas bajo condiciones de fermentación alcohólica lo que abre la posibilidad de plantear experimentos de evolución dirigida en presencia de estos inhibidores químicos para obtener cepas con características de interés. Como se ha comentado en la Introducción (apartado 5), dichos experimentos pueden realizarse con un diseño de crecimiento en continuo o en discontinuo. Como nuestro objetivo es la posible aplicación en la industria vínica se ha seleccionado el modo discontinuo, ya que las condiciones de vinificación lo son y las células sufren ayuno de nutrientes y acumulación de metabolitos tóxicos. Las células se inoculan en el medio seleccionado y se realizan pases cada cierto tiempo hasta alcanzar un número determinado de generaciones.

Los parámetros para realizar evoluciones dirigidas no están establecidos, sobre todo el número de generaciones que deben transcurrir durante la evolución. Gran parte de las evoluciones dirigidas finalizan al alcanzar unas 200-300 generaciones (Caspeta et al., 2016; Kutyna et al., 2012; Tilloy et al., 2014) aunque también hay algunas con un número de generaciones mayor (Koppram et al., 2012) o incluso mucho menor (Peris et al., 2017). En nuestro caso, la cepa seleccionada se inoculó a una D. O.<sub>600</sub> de 0.1 en cada pase y se recogieron

muestras a las 50, 100, 150 y 200 generaciones. Las muestras se sembraron en el medio selectivo adecuado, en función de las condiciones del experimento de evolución dirigida, y se guardaron a -80 °C en presencia de glicerol para su almacenaje y posterior análisis.

### 3.1. Evolución dirigida de la cepa M2 en presencia de rapamicina

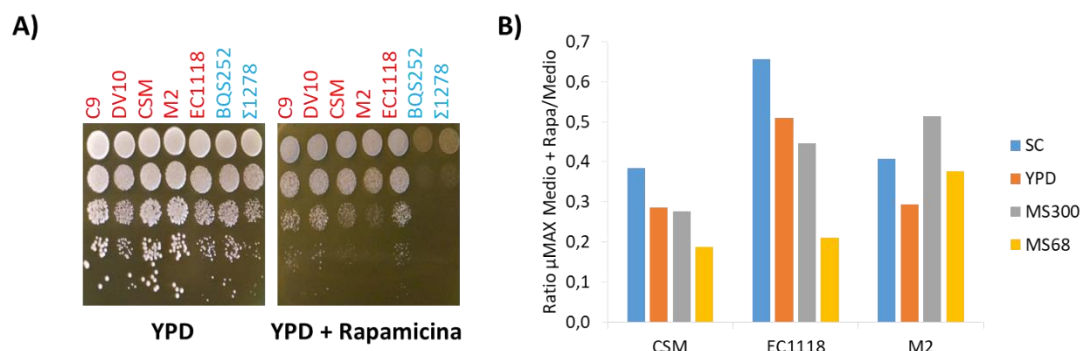
#### 3.1.1. Selección de la cepa M2

El objetivo de la evolución dirigida en presencia de rapamicina es obtener aislados procedentes de M2 más resistentes a rapamicina como consecuencia de una modificación en la actividad o regulación de alguna de las principales rutas de señalización de nutrientes, principalmente TORC1 ya que se está utilizando su inhibidor más directo. Esa mayor resistencia a rapamicina podría indicar una mejora en las condiciones de vinificación como consecuencia de una alteración en la regulación de las rutas de señalización de nutrientes que le permita estar más activa y, por tanto, tener una mayor capacidad fermentativa ya que algunas cepas con requerimientos bajos de nitrógeno eran más tolerantes a rapamicina.

Inicialmente, la evolución dirigida se planteó con las cepas vínicas anteriormente seleccionadas (DV10, CSM, EC1118 y M2) y se realizó un estudio más exhaustivo con las mismas. Como se ha mostrado anteriormente, los fenotipos de las cepas DV10 y EC1118 son muy similares entre sí, al igual que los de las cepas M2 y CSM. Cabe destacar el efecto opuesto frente a la rapamicina y a la 2DG de las cepas M2 y CSM respecto a EC1118 y DV10. M2 y CSM son más sensibles a la rapamicina y EC1118 y DV10 a la 2DG, lo que permiten un margen de mejora mayor. En primer lugar se realizaron goteos en medio YPD en presencia de rapamicina, (Figura 30 panel A). En estos goteos, se añadió la cepa  $\Sigma$ 1278 porque en condiciones normales de crecimiento presenta hiperactiva la ruta Ras/cAMP/PKA, lo que le proporciona una resistencia a rapamicina elevada (Zurita-Martinez y Cardenas, 2005). El genoma de dicha cepa está relacionado con S288c y comparte otras regiones genómicas con W303. Sin embargo, esa mayor tolerancia a la rapamicina que está descrita para la cepa  $\Sigma$ 1278 es mucho menor que la que presentan las cepas vínicas. Las cepas M2 y CSM son las más sensibles mientras que DV10 y EC1118, las más resistentes. La cepa vínica haploide C9, derivada de la L2056, presenta una resistencia intermedia.

A continuación, se realizaron diversas curvas de crecimiento en diferentes medios en presencia y ausencia de rapamicina con el objetivo de determinar qué medio sería el más adecuado para realizar la evolución dirigida (Figura 30 panel B). La cepa DV10 y EC1118 presentan los mismos requerimientos de nitrógeno bajos y comparten fenotipo frente a los inhibidores analizados; sin embargo, en el caso de CSM y M2, aunque comparten fenotipos, los requerimientos son diferentes; CSM presenta un requerimiento normal y la cepa M2 requiere elevadas concentraciones de nitrógeno, lo que otorga un margen de mejora. Por ello, únicamente se analizaron las cepas CSM, M2 y EC1118. Los medios estudiados fueron: medio mínimo completo SC, medio rico YPD y mostos sintéticos MS300 y MS68. Se barajó la idea de realizar la evolución dirigida en MS68, que presenta nitrógeno limitante pero se descartó ya que como consecuencia de un crecimiento muy bajo, el tiempo necesario para obtener las generaciones determinadas era muy elevado. La selección del medio para la evolución dirigida es primordial puesto que en presencia de rapamicina el crecimiento debe verse afectado en el medio seleccionado pero no en gran medida como para inhibirlo completamente. En el panel B de la Figura 30 se muestran los resultados procedentes de las curvas de crecimiento realizadas con las cepas CSM, EC1118 y M2 en los medios indicados. Al obtener valores menores de 1 de la relación entre la velocidad máxima de crecimiento en presencia y ausencia de rapamicina, se observa que la rapamicina influye en el crecimiento de las cepas analizadas,

independientemente del medio de cultivo. El crecimiento de la cepa EC1118 es el que menos se ve afectado como consecuencia de la presencia de rapamicina, sobre todo en medio completo SC. Aunque las relaciones observadas para la cepa CSM son menores que las observadas para M2 cuando se usan mostos sintéticos, la D.O.<sub>600</sub> final es mucho menor para la cepa M2 (datos no mostrados). Ambas cepas muestran comportamientos similares en medios de laboratorio SC e YPD.



**Figura 30.** Selección de la cepa M2 y del medio correspondiente para realizar la evolución dirigida. Goteos en placa en medio completo YPD con rapamicina (100 nM) de las cepas vínicas (en rojo) y de laboratorio (en azul) (A). Relaciones de las velocidades máximas de crecimiento en presencia de rapamicina (200 ng/μL) y ausencia de la misma, procedente de las curvas de crecimiento realizadas con las cepas vínicas CSM, EC1118 y M2 en los medios indicados (B).

También se siguió la D.O.<sub>600</sub> en medio mínimo SD y medio completo SC en presencia de rapamicina, Tabla 8. La diferencia entre ambos medios radica en la presencia de suplemento de aminoácidos (*drop out*, apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos) en el medio SC. Aunque la mayor diferencia entre el medio SD y SC en presencia de rapamicina se encuentra en la cepa EC1118, la D.O.<sub>600</sub> final a tiempo 48 horas es menor en la cepa M2 indicando la menor tolerancia a rapamicina de la cepa.

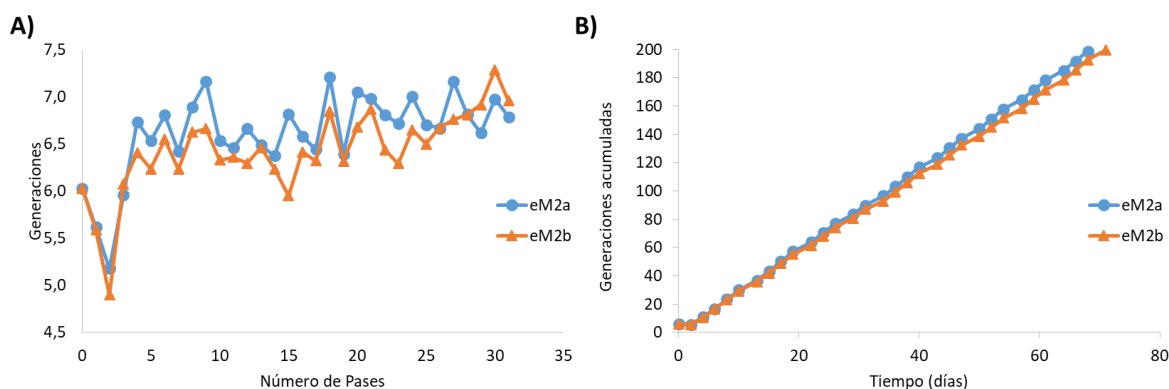
**Tabla 8.** Selección del medio SC para la realización de la evolución dirigida. Datos procedentes de curvas de crecimiento en medio mínimo SD y medio completo SC con rapamicina (200 ng/μL). Se muestran las relaciones entre ambos medios y la D.O.<sub>600</sub> a 48 h.

	D.O. <sub>600</sub> (48 h)		
	Ratio SD+Rapa/SC+Rapa	SC+Rapa	SD+Rapa
EC1118	0.64	10.28	6.58
CSM	0.78	8.98	7.00
M2	0.69	4.70	3.24

A raíz de la menor tolerancia de la cepa M2 frente a rapamicina, se seleccionó dicha cepa para la evolución dirigida en presencia de rapamicina (100 nM). El medio en el que se realizó fue medio mínimo completo SC puesto que el medio SD, al presentar el sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, podría ralentizar en gran medida el crecimiento de la cepa y, por tanto, la evolución dirigida, además de ser más diferente a los medios industriales complejos que contienen mezclas variadas de fuentes de nitrógeno. Se recogieron muestras a 50, 100, 150 y 200 generaciones.

### 3.1.2. Seguimiento de la evolución

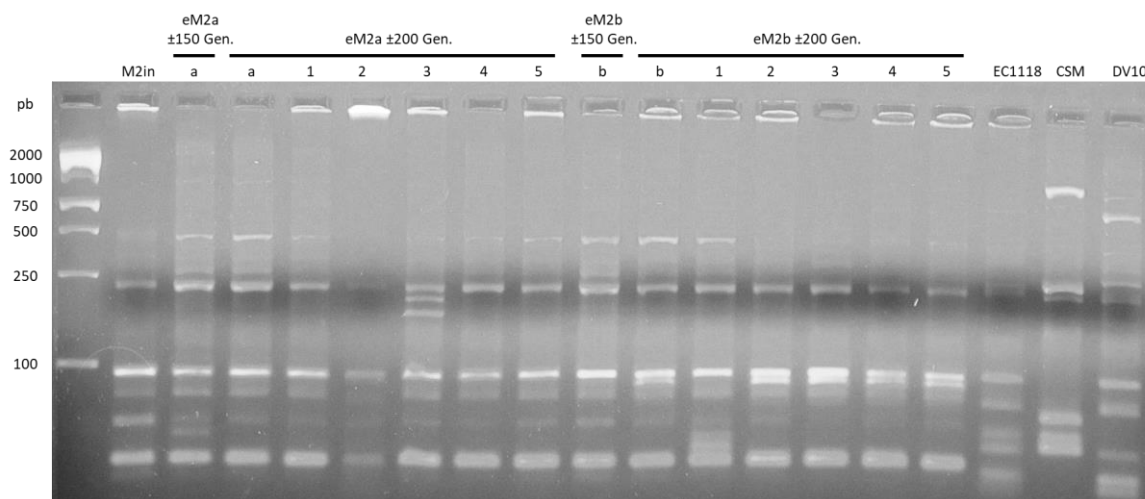
Inicialmente, una única colonia de M2 (M2in) se utilizó para inocular dos matraces con 25 mL de medio mínimo completo SC con rapamicina. Se realizaron dos evoluciones dirigidas en paralelo, nombradas como eM2a y eM2b. Los pases se realizaron cada 48 horas y se inoculó cada vez a una D. O.<sub>600</sub> de 0.1. La determinación del número de generaciones se realizó a partir de los datos obtenidos de la D.O.<sub>600</sub> de cada uno de los pases realizados. En la Figura 31 se muestra el progreso de la evolución dirigida. Se observa un aumento del número de generaciones por unidad de tiempo a partir del cuarto día de evolución dirigida como consecuencia de un mayor crecimiento en presencia de rapamicina (Figura 31 panel A). La acumulación de generaciones a lo largo de la evolución dirigida también es bastante similar entre eM2a y eM2b aunque puede observarse una cierta separación a tiempos más largos (Figura 31 panel B). Ese rápido aumento observado al inicio de la evolución también se ha observado en otras evoluciones dirigidas (Xu et al., 2019). En este caso, la evolución dirigida se hizo en presencia de ácido propiónico con el objetivo de aumentar la tolerancia al mismo de la cepa CEN.PK. Además, la comprobación de contaminaciones se realizó no solo mediante observación bajo el microscopio óptico sino también por siembra en medio rico YPD y medio YPD más rapamicina. Cabe destacar que las colonias obtenidas en YPD con rapamicina eran de pequeño tamaño al inicio de la evolución dirigida indicando su menor tolerancia al compuesto y que fueron aumentando de tamaño a lo largo de la evolución indicativo de un aumento de la resistencia a rapamicina (datos no mostrados).



**Figura 31.** Seguimiento de la evolución dirigida de la cepa M2 en presencia de rapamicina en medio completo SC. Generaciones obtenidas en cada uno de los pases realizados durante la evolución dirigida tanto de la réplica a (eM2a) como de la réplica b (eM2b) (A). Generaciones acumuladas a lo largo de la evolución dirigida (B).

#### 3.1.2.1. Comprobación de la identidad de las cepas evolucionadas mediante amplificación de elementos delta

El seguimiento de la evolución dirigida es de gran importancia puesto que puede sufrir contaminaciones y obtener finalmente una cepa evolucionada procedente de la contaminación y no de la cepa de interés. Para comprobar si durante la evolución dirigida se produjeron contaminaciones se amplificaron las regiones de los elementos delta (Legras y Karst, 2003) a partir del DNA genómico extraído de las cepas evolucionadas a 150 generaciones, 5 colonias diferentes de eM2a y eM2b una vez transcurridas las 200 generaciones junto con la cepa inicial M2in y las cepas EC1118, CSM y DV10. Los resultados de la amplificación se muestran en la Figura 32.



**Figura 32.** Amplificación de elementos delta de las cepas procedentes de la evolución dirigida en presencia de rapamicina. Los números del 1 al 5 indican las colonias que se han aislado de cada una de las réplicas de la evolución a 200 generaciones y las letras a y b la colonia seleccionada de las evoluciones. Las condiciones de la amplificación se detallan en Materiales y Métodos. Se indica el tamaño de las bandas del DNA utilizado como marcador.

Las cepas eM2a y eM2b evolucionadas durante 150 generaciones no presentan ninguna diferencia en el perfil de amplificación. Se observan diferencias en los perfiles de las cinco colonias analizadas dentro de la cepa evolucionada eM2a a 200 generaciones. La colonia número 3 presenta una amplificación adicional de dos bandas (aproximadamente 250 pb) que no están presentes ni en la cepa M2in ni en las demás colonias. Respecto a eM2b evolucionada durante 200 generaciones, puede observarse una amplificación adicional respecto a M2in de una banda de aproximadamente 100 pb en todas las colonias analizadas a excepción de la número 1.

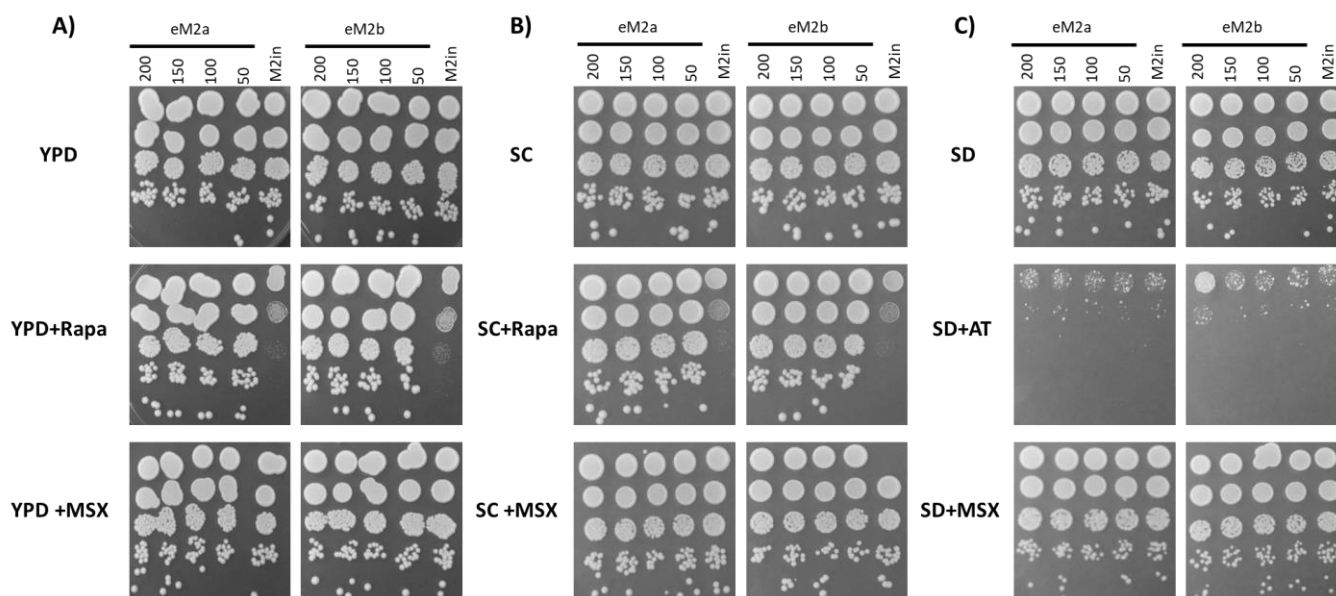
La similitud fenotípica entre M2 y CSM y entre las cepas EC1118 y DV10 respecto a la tolerancia frente a diversos inhibidores químicos también se mantiene en la amplificación de los elementos delta. Los perfiles de las cepas EC1118 y DV10 son más similares entre sí, al igual que los obtenidos para las cepas M2 y CSM.

En ningún caso se observan grandes diferencias en el perfil entre la cepa M2in y las cepas evolucionadas, ya sea durante 150 o 200 generaciones, aunque sí aparecen bandas adicionales. Debido a la aparición de esas bandas adicionales, se siguió analizando las colonias que las presentaban mediante vinificación en mosto sintético y mosto natural y también mediante goteos frente a diversos inhibidores.



### 3.1.3. Análisis de las distintas generaciones obtenidas durante la evolución dirigida frente a rapamicina

Como se ha comentado anteriormente no existe una metodología específica para las evoluciones dirigidas en cuanto al número de generaciones que deben transcurrir para que se observen cambios y que dichos cambios sean permanentes, ya que depende de la cepa a evolucionar y del tipo de modificación a obtener. Por ello se analizó el fenotipo de crecimiento de las cepas obtenidas por evolución dirigida frente a rapamicina, a distinto número de generaciones (50, 100, 150 y 200), mediante goteos en placa frente a diversos inhibidores químicos y distintos medios, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 33. Los experimentos se realizaron a partir de los glicerizados de las generaciones correspondientes.



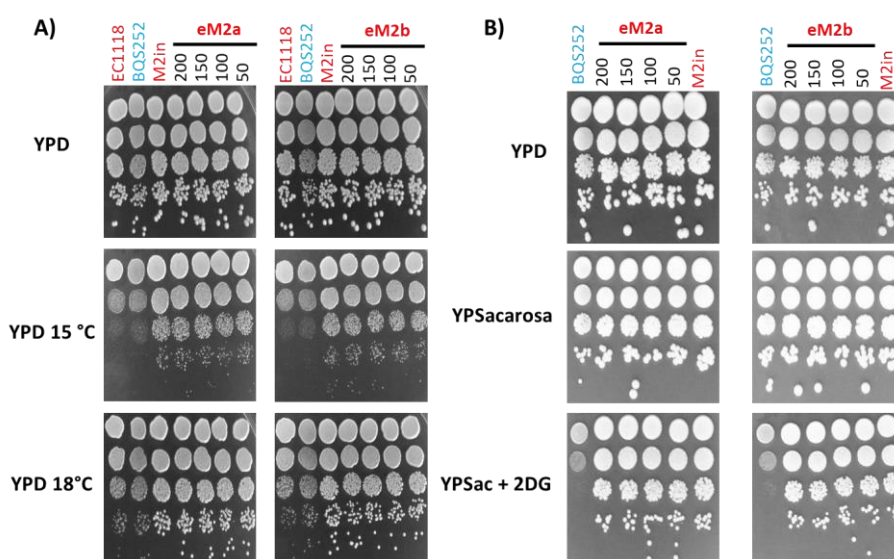
**Figura 33.** Crecimiento de las células adaptadas en presencia de rapamicina en presencia de diversos inhibidores químicos. Goteos de las cepas evolucionadas frente a rapamicina a 50, 100, 150 y 200 generaciones de eM2a y eM2b, realizados en medio completo YPD (A), medio mínimo completo SC (B) y medio mínimo SD (C) a los cuales se les ha añadido rapamicina (100 nM), MSX (1 mM) y 3-aminotriazol (AT, 10 mM).

Al ser la rapamicina un inhibidor directo de TORC1, complejo que responde al ayuno de nitrógeno, se consideró necesario realizar el análisis de las distintas generaciones en diversos medios cuya diferencia radica principalmente en la fuente de nitrógeno utilizada. En el panel A de la Figura 33 los goteos se realizaron en medio completo YPD con rapamicina, compuesto frente al cual se realizó la evolución, y con MSX, inhibidor de la glutamina sintetasa. En este caso, se observa un aumento muy claro de la tolerancia a rapamicina entre la cepa M2in y las cepas evolucionadas, indistintamente de las generaciones transcurridas. El fenotipo obtenido en presencia de MSX no varía entre las cepas analizadas. En el panel B se muestran goteos equivalentes en medio SC, medio en el que se realizó la evolución dirigida y cuya fuente de nitrógeno se considera rica al estar compuesta por aminoácidos y sulfato de amonio. Las tolerancias a rapamicina y a MSX son muy similares a las observadas en medio completo YPD. Por último, las cepas evolucionadas se cultivaron en el medio mínimo SD, donde el sulfato de amonio es la única fuente de nitrógeno, panel C. En dicho medio, tampoco se observan diferencias en el crecimiento en presencia del inhibidor 3-aminotriazol, inhibidor de la síntesis

de histidina. La tolerancia de las cepas evolucionadas y de la cepa M2in frente al MSX es también muy similar.

También se analizó el crecimiento a diferentes temperaturas, como se muestra en el panel A de la Figura 34. El rango óptimo de crecimiento de las cepas vínicas es mayor que las de las cepas de laboratorio. Aun así, se aprecian diferencias de crecimiento entre la cepa EC1118 y M2 ya observado anteriormente (Figura 16); a pesar de que el rango óptimo es muy similar entre ambas. En este caso, tampoco se observa un fenotipo diferencial claro entre las generaciones analizadas.

El uso de inhibidores de la síntesis de aminoácidos sugiere que el único fenotipo observado en las cepas evolucionadas es la mayor tolerancia frente a rapamicina, indicativo de que se ha producido alguna modificación que permita esa mayor tolerancia. Sin embargo, aunque la inhibición de la rapamicina produce una inactivación de TORC1, también podría haberse producido una modificación en la regulación de otras rutas de señalización de nutrientes. Por ello, se analizó el crecimiento en sacarosa, una fuente fermentable, en presencia de 2-desoxiglucosa. En el panel B de la Figura 34 no se aprecia ninguna diferencia en la tolerancia frente a dicho compuesto entre la cepa M2in y las cepas evolucionadas aunque sí respecto a la cepa de laboratorio BQS252, diferencia comentada anteriormente (Figura 15 panel B).



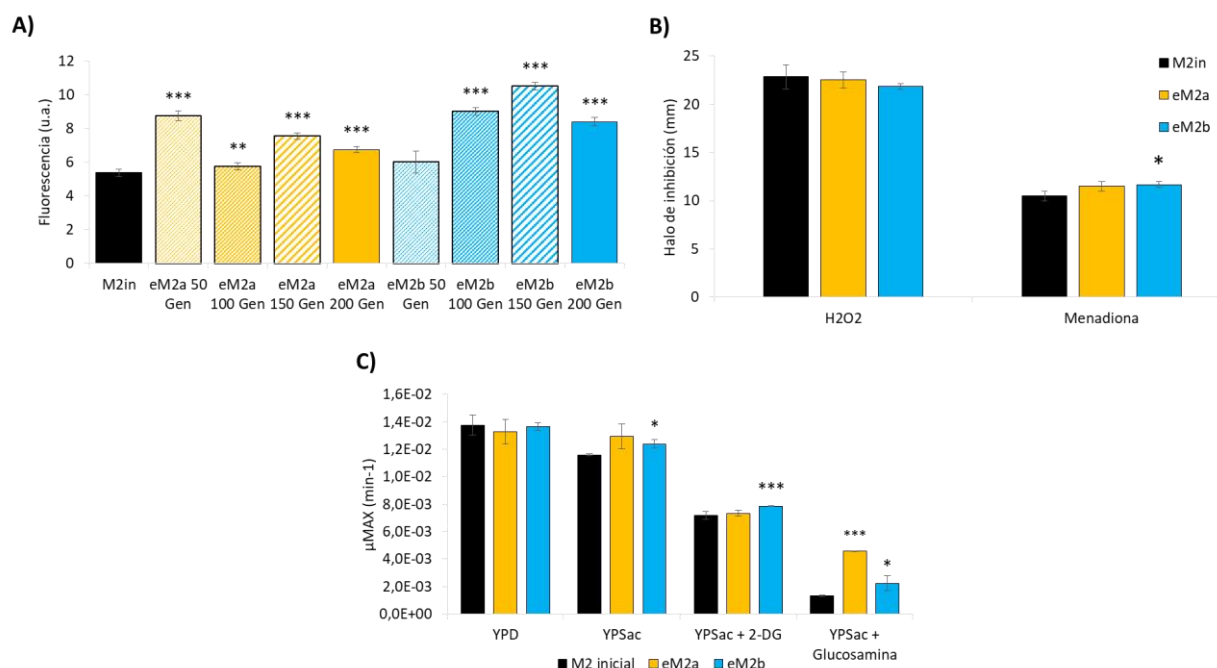
**Figura 34.** Efectos sobre el crecimiento en las diferentes generaciones obtenidas en la evolución dirigida frente a rapamicina en diversos medios y condiciones de crecimiento. Goteos de las cepas evolucionadas en placas de medio completo YPD incubadas a 15 y 18 °C durante tres días (A). Goteos en medio completo YPD, YPSacarosa e YPSacarosa con 2-desoxiglucosa (2DG, 100 µg/mL) (B). Azul: cepas de laboratorio Rojo: cepas vínicas.

Con el objetivo de indagar más en los cambios producidos durante la evolución dirigida en las diferentes generaciones, se determinaron los niveles de anión superóxido con la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE), sensible a los niveles de ROS, la tolerancia frente al estrés oxidativo mediante determinación de halos de inhibición del crecimiento en placa y la represión por glucosa mediante el crecimiento en sacarosa en presencia de análogos estructurales no metabolizables de la glucosa. Según Neklesa y Davis (2008), niveles elevados de anión superóxido dificultan la unión de la rapamicina al complejo TORC1 aumentando así la tolerancia a rapamicina. Los niveles de anión superóxido de las cepas evolucionadas se

muestran en el panel A de la Figura 35 donde no se observa una tendencia continua al alza al aumentar el número de generaciones de la evolución dirigida. Sin embargo, los niveles de anión superóxido de las cepas evolucionadas son mayores que los de la cepa M2in indicando una posible explicación al aumento de la tolerancia frente a la rapamicina.

Para analizar si esa producción aumentada de ROS se refleja en una resistencia a estrés oxidativo alterada, se ensayó la tolerancia de las cepas eM2a y eM2b transcurridas 200 generaciones (procedente de glicerinado) frente a peróxido de hidrógeno y menadiona, ambos generadores de ROS, Figura 35 panel B. La menadiona es una quinona que genera ROS, principalmente el anión superóxido. Mientras que no se observan diferencias en el halo de inhibición entre las cepas evolucionadas y la cepa inicial M2in en  $H_2O_2$ , sí que se observan pequeñas diferencias en menadiona, aunque el halo de inhibición que induce la menadiona es mucho menor que el producido por el peróxido de hidrógeno. El halo de inhibición causado por la menadiona en la cepa eM2b es significativamente mayor que en la cepa M2in indicando que tras 200 generaciones de evolución en presencia de rapamicina es más sensible al estrés oxidativo causado por anión superóxido. También se observa cierto aumento en la cepa eM2a frente a la menadiona, pero no estadísticamente significativo. Así pues, parece que el aumento de la resistencia a rapamicina está relacionado con un aumento de las ROS en las cepas evolucionadas, al menos parcialmente.

También se analizó el crecimiento en sacarosa en presencia de análogos estructurales no metabolizables de la glucosa, como la 2-desoxiglucosa o la glucosamina, de las cepas evolucionadas eM2a y eM2b transcurridas 200 generaciones (procedente de glicerinado) (Figura 35 panel C). La cepa evolucionada eM2b presenta un mayor crecimiento en presencia de YPSac y de los análogos 2DG y GlcN. La cepa eM2a presenta un crecimiento mayor estadísticamente significativo únicamente en presencia de GlcN y no de 2DG sugiriendo que la modificación producida afecta a algún proceso previo al paso de fosforilación de la glucosa. Ese mayor crecimiento de las cepas evolucionadas en sacarosa en presencia de los dos análogos estructurales no metabolizables de la glucosa sugiere que en ellas se ha producido una cierta relajación de la represión por glucosa que las hace capaces de crecer mejor en fuentes alternativas de carbono en condiciones que deberían imponer la represión completa.

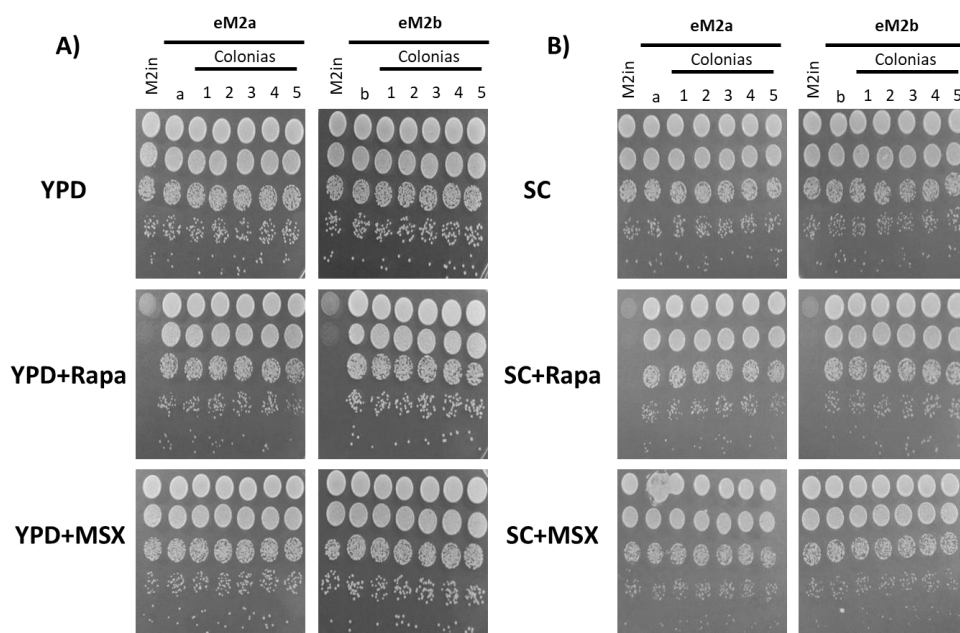


**Figura 35.** Efecto de la evolución dirigida frente a rapamicina en la acumulación de anión superóxido, en la tolerancia estrés oxidativo y en la represión por glucosa. Fluorescencia obtenida de la tinción con dihidroetidio (DHE) de cepas evolucionadas en fase estacionaria de crecimiento en medio completo YPD. El análisis estadístico se realiza frente a la cepa M2in (A). Halo de inhibición (mm) del crecimiento en placa en medio completo YPD con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 % (v/v) o menadiona (0.1 M) (B). Velocidad de crecimiento máxima obtenida de las curvas de crecimiento de las cepas evolucionadas a 200 generaciones cultivadas en medio completo YPD y medio con sacarosa como fuente de carbono en presencia de 2-desoxiglucosa (2DG, 100 μg/mL) o glucosamina (GlcN, 0.05 %) (C). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias (\* P-valor ≤ 0.05; \*\* P-valor ≤ 0.01; \*\*\* P-valor ≤ 0.005) respecto de la cepa M2in dentro de cada medio analizado.

El análisis de las distintas generaciones producidas durante la evolución dirigida de la cepa M2 deja patente que no se observa una variación progresiva del fenotipo, indicando que la adaptación al efecto inhibitorio de la rapamicina se ha producido en las primeras generaciones. Los posteriores análisis realizados con las cepas procedentes de la evolución dirigida se realizaron con las cepas transcurridas 200 generaciones.

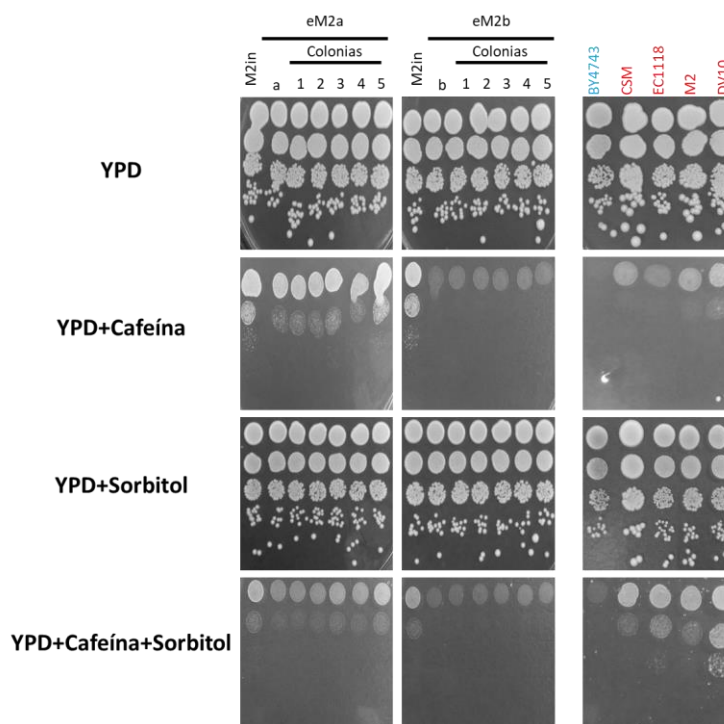
#### 3.1.4. Análisis de las distintas colonias obtenidas de las cepas M2 evolucionadas frente a rapamicina durante 200 generaciones

Una vez transcurridas las 200 generaciones, se seleccionaron 5 colonias de cada una de las réplicas de la evolución dirigida con el objetivo de seleccionar aquellas variaciones más interesantes. Se realizaron análisis del crecimiento mediante goteos tanto en medio completo YPD como en medio mínimo completo SC en presencia de rapamicina y MSX. Como muestra la Figura 36, no se observan diferencias en la tolerancia a los inhibidores analizados entre las diferentes colonias analizadas.



**Figura 36.** Crecimiento frente a diversos inhibidores químicos de las diferentes colonias aisladas de las cepas evolucionadas frente a rapamicina durante 200 generaciones. Goteos realizados en medio completo YPD (A) y medio completo SC (B), con la adición de rapamicina (100 nM) y MSX (1 mM). Las dos evoluciones dirigidas en paralelo se nombran con la letra a y b.

Adicionalmente, también se realizaron goteos en presencia de cafeína y sorbitol. La cafeína es un inhibidor del complejo TORC1. Según Martín et al., (1996) el sorbitol es capaz de recuperar el fenotipo de la cafeína ya que ésta afecta a la integridad de la membrana celular. En la Figura 37 se observan los goteos realizados en presencia de cafeína y sorbitol. La evolución eM2a no altera la sensibilidad de la cepa parental a la cafeína, pero las cepas proclutas de la evolución eM2b son más sensibles a la misma, sugiriendo que la mutación puede afectar a las regiones del complejo que son diana de la cafeína a la vez que a las que son afectadas por la rapamicina. Tal y como se muestra, las cepas vínicas son más resistentes a cafeína pero el sorbitol únicamente recupera parcialmente el fenotipo de inhibición del crecimiento causado por la cafeína. Las cepas evolucionadas son sensibles a la cafeína y dicho fenotipo no se recupera en presencia de sorbitol (última fila). Estos resultados indican que la mayor tolerancia de las cepas evolucionadas a la rapamicina no es como consecuencia de una alteración en la estabilidad o integridad de la pared ya que el sorbitol no recupera el fenotipo frente a cafeína de las cepas evolucionadas frente a rapamicina.

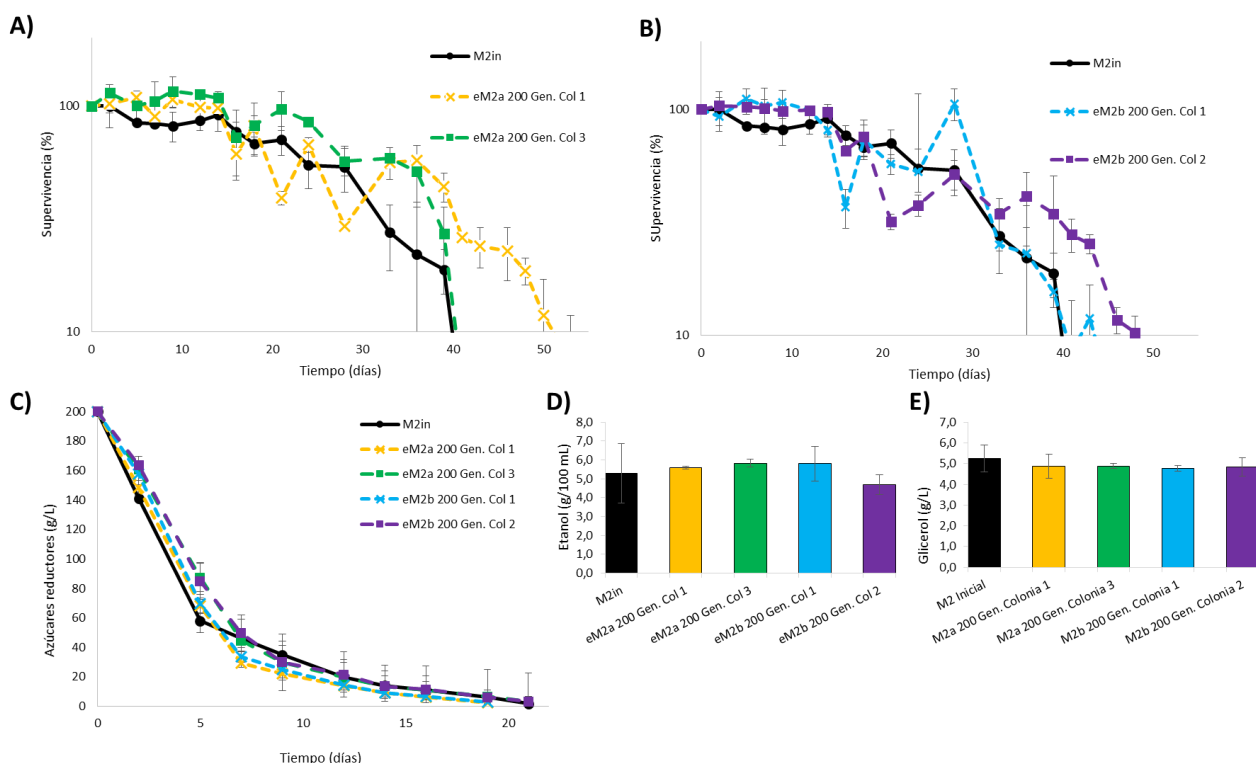


**Figura 37.** Efecto de la cafeína y sorbitol sobre el crecimiento de diferentes colonias de las cepas eM2a y eM2b obtenidas después de 200 generaciones de evolución en rapamicina y diversas cepas vnicas. Se realizaron goteos en medio completo YPD en presencia de cafeína (20 mM) y sorbitol (0.5 M). Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vnicas.

### 3.1.5. Efecto de la adaptación a rapamicina en condiciones de vinificación

#### 3.1.5.1. Vinificaciones en mosto sintético MS68 y mosto natural. Evaluación de la capacidad fermentadora

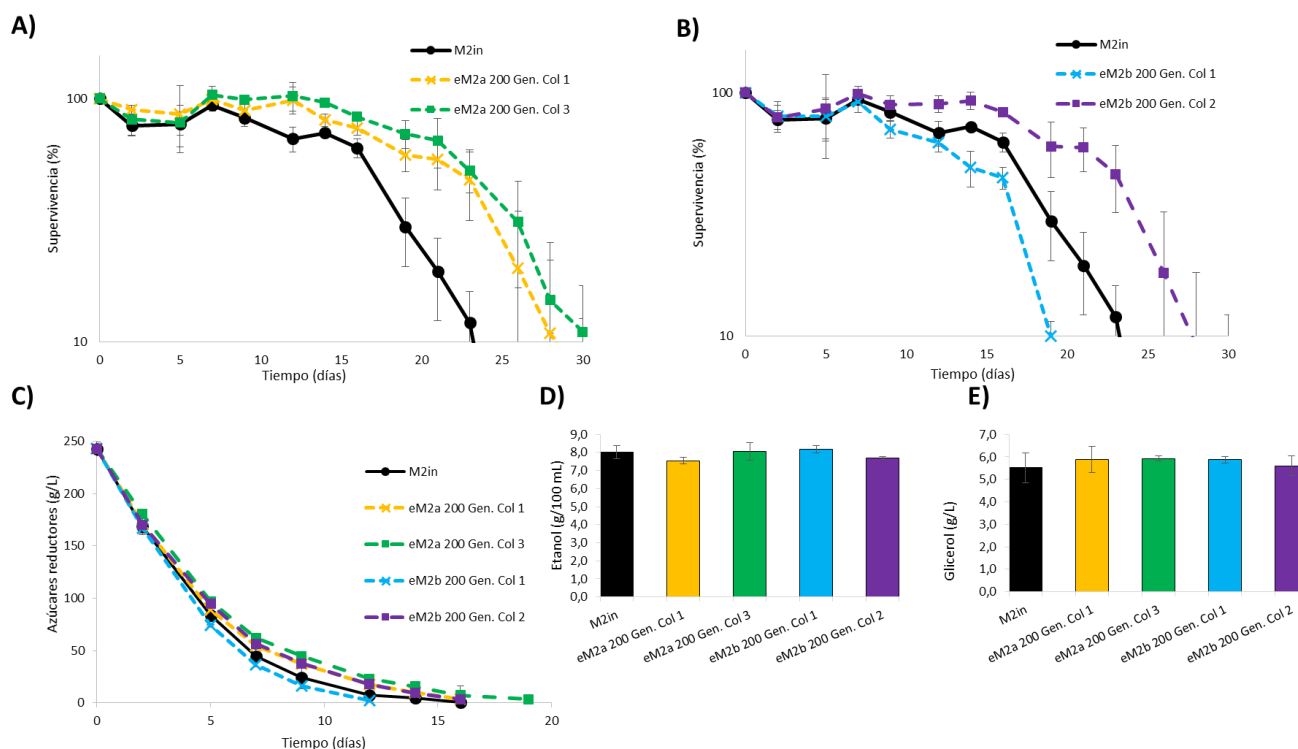
A raíz de los perfiles obtenidos de la amplificación de los elementos delta (Figura 32) y para analizar en más detalle las cepas evolucionadas, se procedió a realizar una vinificación en mosto sintético MS68 de las cepas M2in, las colonias 1 y 3 de la cepa eM2a y las colonias 1 y 2 de la cepa eM2b. En la Figura 38 se muestran los resultados de la determinación de la longevidad cronológica de las cepas ensayadas en mosto MS68 (paneles A y B) así como la cinética de consumo de azúcares fermentables (panel C) y la producción final de etanol (panel D) y de glicerol (panel E). Aunque no se observaron diferencias en el crecimiento en las distintas cepas analizadas (datos no mostrados), se observa un ligero aumento de la longevidad cronológica en las cepas eM2a colonia 1 y eM2b colonia 2. Todas las cepas evolucionadas son capaces de completar el consumo de azúcares, aunque la colonia 2 de eM2b sufre un retraso de 2 días, y finalizan la fermentación (Figura 38 panel C). No se producen diferencias estadísticamente significativas en la producción de etanol y glicerol (Figura 38, paneles D y E).



**Figura 38.** Comportamiento fermentativo de las cepas evolucionadas en presencia de rapamicina en condiciones de vinificación en mosto sintético MS68. Curvas de longevidad cronológica obtenida a partir de las u.f.c./mL de dos de las colonias de la evolución eM2a (A) y eM2b (B). Curvas de consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Concentración de etanol (g/100 mL) (D) y glicerol (g/L) (E) al finalizar la fermentación alcohólica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Se procedió a realizar otra fermentación pero en este caso con mosto Bobal analizándose los mismos parámetros detallados en la fermentación en MS68. En la Figura 39, puede verse como la longevidad cronológica de las colonias 1 y 3 de la cepa eM2a es ligeramente mayor que la de la cepa inicial M2in (panel A). Ese aumento de la longevidad también puede observarse en la colonia 1 de la eM2b pero no en la colonia 2 de la misma cepa, cuya longevidad cronológica es ligeramente inferior (panel B). La duración de la vinificación en MS68 es mayor que en mosto Bobal por lo que el aumento de la longevidad cronológica observada en las cepas evolucionadas tiene menor efecto en mosto Bobal que en MS68.

El consumo de azúcares reductores es muy similar en todas las cepas (Figura 39 panel C); a excepción de un retraso de 2 días para la cepa eM2a colonia 3. Se determinó tanto el etanol (panel D) como el glicerol (panel E) al final de la fermentación y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas analizadas, a pesar del retraso observado para la cepa eM2a colonia 3.



**Figura 39.** Comportamiento de las cepas evolucionadas en presencia de rapamicina en condiciones de vinificación en mosto natural variedad Bobal. Curvas de longevidad cronológica obtenida a partir de las u.f.c./mL de dos de las colonias de la evolución eM2a (A) y eM2b (B). Curva de consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Concentración de etanol (g/100 mL) (D) y glicerol (g/L) (E) al finalizar la fermentación alcohólica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos en el estudio de los fenotipos de crecimiento mediante goteos en placa y en la caracterización del comportamiento fermentativo en vinificaciones en mostos sintético y natural indican que las diferencias genéticas observadas en la caracterización molecular mediante amplificación de los elementos delta de diferentes colonias procedentes de los experimentos de evolución dirigida frente a rapamicina no conllevan cambios significativos ni en la producción de metabolitos de interés enológico, ni una mejora significativa en los parámetros enológicos, aunque si pueden apreciarse cambios en la longevidad cronológica producidos en la evolución.

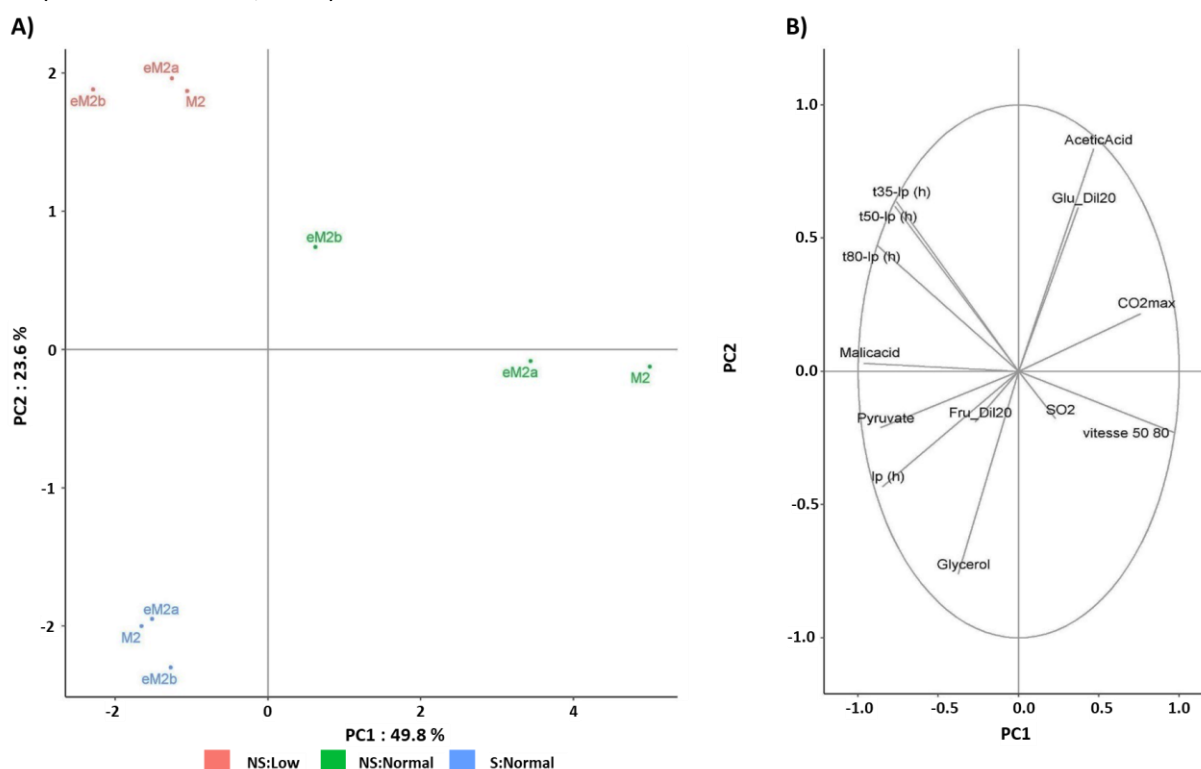
### 3.1.6. Análisis fenómico procedente de fermentaciones estandarizadas de las cepas evolucionadas frente a rapamicina

En colaboración con el laboratorio del Dr. Philippe Marullo, de la Universidad de Burdeos se llevó a cabo un análisis fenotípico exhaustivo de las cepas obtenidas por evolución dirigida frente a rapamicina, utilizando la metodología de fermentación a pequeña escala puesta a punto para evaluar cuantitativamente rasgos de un gran número de muestras en vinificación (Peltier et al., 2018). Tal y como indica la Tabla 5, el mosto presenta inicialmente una concentración de nitrógeno asimilable de 100 mg/L. El mosto se suplementó con sulfato de amonio y con un stock de  $\alpha$ -aminoácidos hasta una concentración de nitrógeno final de 250 mg/L. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken), agitación nitrógeno normal



(S:Normal, S:Shaken) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso. Los parámetros cinéticos determinados a partir de la pérdida de peso debido a la liberación de CO<sub>2</sub> fueron la fase de latencia (Ip), el tiempo para liberar el 35, el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub> max restando la Ip (t35-Ip, t50-Ip y t80-Ip) y la velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (v50\_80). Los parámetros enológicos medidos al finalizar la fermentación a partir del sobrenadante fueron: fructosa y glucosa residual (Fru\_Dil20, Glu\_Dil20), piruvato, glicerol, ácido acético, ácido málico y SO<sub>2</sub>

En la Figura 40 se muestra un análisis global de las cepas evolucionadas frente a rapamicina. El análisis de componentes principales (PCA, Figura 40, panel A) muestra que los perfiles de cada una de las condiciones analizadas son diferentes y se agrupan en función de la condición, no habiendo ninguna cepa evolucionada que se aleje de la cepa de partida, excepto eM2b que en la condición NS:Normal se encuentra en un cuadrante distinto. Además, también se muestra un gráfico de correlación (Figura 40 panel B) indicando la relación entre los parámetros cinéticos y enológicos medidos en las tres condiciones analizadas de todas las cepas evolucionadas, incluyendo a M2in. La correlación entre el ácido acético (AceticAcid) y el glicerol (Glycerol) es negativa, debido a la oposición de sus flechas, por lo que a mayor ácido acético menor glicerol y viceversa. Este resultado corrobora los observados en los experimentos cuyo objetivo es la sobreproducción de glicerol. Esa sobreproducción conlleva, como efecto colateral, un aumento del ácido acético, producto indeseable en el vino (Taherzadeh et al., 2002).



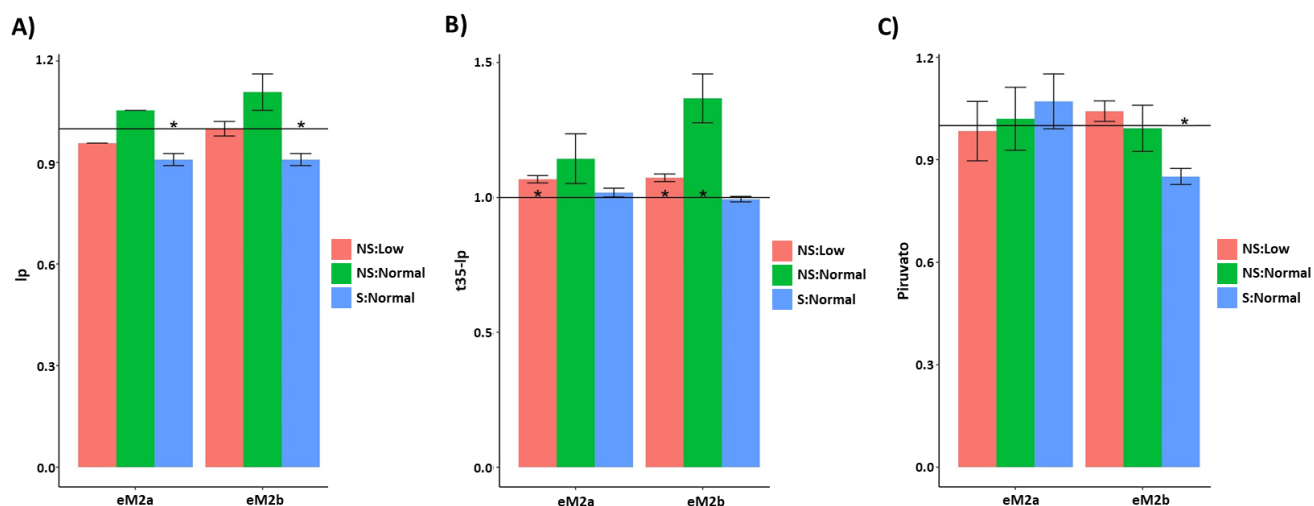
**Figura 40.** Análisis global en vinificación en mosto Sauvignon Blanc de las cepas evolucionadas frente a rapamicina. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de las cepas evolucionadas y la cepa inicial (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not Shaken: Normal, verde),

agitación nitrógeno normal (S:Normal, Shaken: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, Not Shaken:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (lp), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta lp (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_Dil20 y Fru\_Dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

De entre todos los parámetros analizados, únicamente cabe comentar las diferencias observadas en las condiciones de crecimiento ensayadas en la fase de latencia (panel A), el piruvato producido (panel B) y el tiempo en liberar el 35 % de CO<sub>2</sub> (panel C), parámetros que se muestran en la Figura 41. Los demás parámetros no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Las gráficas muestran los datos medios de las tres réplicas realizadas normalizados frente a los datos obtenidos para la cepa M2in. Por tanto, aquellos datos superiores a 1 indican que los valores son mayores para las cepas evolucionadas y valores menores que 1 indican valores menores que las cepas evolucionadas. La fase de latencia (panel A) es menor en condiciones de agitación sugiriendo que el oxígeno favorece la adaptación al mosto en las dos evoluciones realizadas (eM2a y eM2b color azul), siendo una ventaja en estas condiciones pero no que no se da en las condiciones más similares a la fermentación vinica estándar (NS:Normal). En el caso de las condiciones de nitrógeno, la baja concentración de nitrógeno presente en el mosto (barra roja) no parece tener efecto en la fase de latencia.

En el panel B de la Figura 41 se muestra el tiempo en liberar el 35 % de CO<sub>2</sub>max. La agitación (barra azul) no permite distinguir las cepas evolucionadas respecto a la cepa inicial M2in, ya que los valores normalizados son muy cercanos a 1. Sin embargo, en condiciones deficientes de nitrógeno (barra roja), las cepas evolucionadas presentan un t35-lp estadísticamente mayor que la cepa M2in sugiriendo que las cepas evolucionadas, aunque su adaptación al mosto es similar en condiciones NS:Low (barra roja), la capacidad fermentativa se ve reducida en las mismas condiciones (panel B, barra roja). La disminución de la capacidad fermentativa también se observa en condiciones NS:Normal (barra verde, panel B), donde ambas cepas evolucionadas presentan valores t35-lp mayores que la cepa M2in, siendo estadísticamente significativo para la cepa eM2b. Por lo tanto, la evolución no ha conllevado una mejora en este parámetro. En el panel C de la Figura 41 se muestra la acumulación o la reducción de los niveles de piruvato de las cepas evolucionadas respecto de la cepa M2in en las tres condiciones analizadas previamente. La única diferencia estadísticamente significativa que se observa es en condiciones de agitación (barra azul) para la cepa eM2b, la cual presenta una menor concentración de piruvato que la cepa M2in en esas mismas condiciones. Esa reducción de ácido acético no supone una modificación de los niveles de glicerol (datos no mostrados).

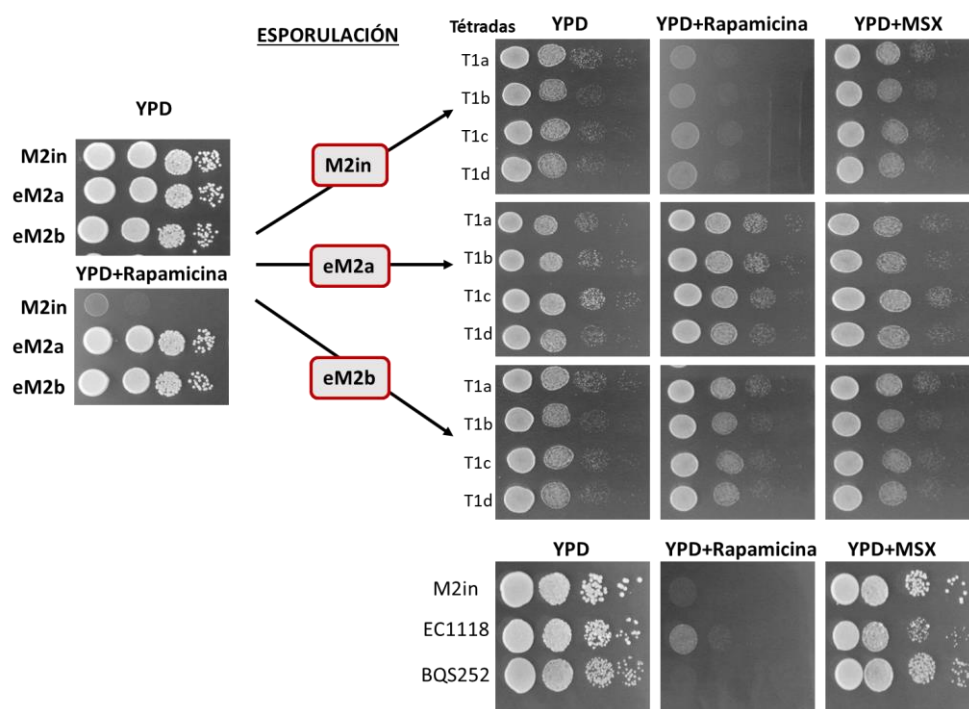


**Figura 41.** Parámetros cinéticos y enológicos durante la fermentación alcohólica de mosto sauvignon blanc de cepas derivadas de M2 sometidas a evolución en presencia de rapamicina. Fase de latencia ( $I_p$ , h) (A), tiempo en liberar el 35 % del  $CO_2$  substrayendo el tiempo de latencia ( $t_{35-Ip}$ ) (B) y piruvato (mg/L) (C). Se muestra el valor medio obtenido de las tres réplicas realizadas de las cepas evolucionadas normalizado frente al valor medio obtenido de las tres réplicas realizadas de la cepa M2in, todo ello expresado en tanto por 1 respecto a M2in. Las condiciones analizadas han sido: sin agitación y con baja concentración de nitrógeno (NS:Low, Not Shaken:Low, rojo); sin agitación y con concentración adecuada de nitrógeno (NS:Normal, Not Shaken: Normal, verde); con agitación y con concentración adecuada de nitrógeno (S:Normal, Shaken: Normal, azul). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre la cepa evolucionada y la cepa M2in para cada una de las condiciones analizadas y parámetros mostrados. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

En conclusión, la evolución dirigida ha permitido aumentar la tolerancia de la cepa M2 frente a la rapamicina pero el análisis de crecimiento mediante goteos utilizando diversos inhibidores y los datos fenotípicos procedentes de diversas vinificaciones indican que es el único fenotipo observable. Los cambios inducidos como consecuencia del crecimiento reiterativo en presencia de rapamicina pueden ser tan mínimos que sea muy difícil su detección, como ha sido descrito en otros experimentos de evolución dirigida. Caspeta et al., (2016) realizaron una evolución dirigida para aumentar la tolerancia a altas temperaturas en la que mostraron que los 7 aislados obtenidos de dicha evolución presentaban secuencias muy similares. De entre los aislados secuenciados, únicamente observaron ciertas modificaciones en los análisis transcriptómicos pero la respuesta global de adaptación a altas temperaturas fue la misma.

### 3.1.7. Bases genéticas de la mayor tolerancia a rapamicina de las cepas evolucionadas frente a dicho compuesto

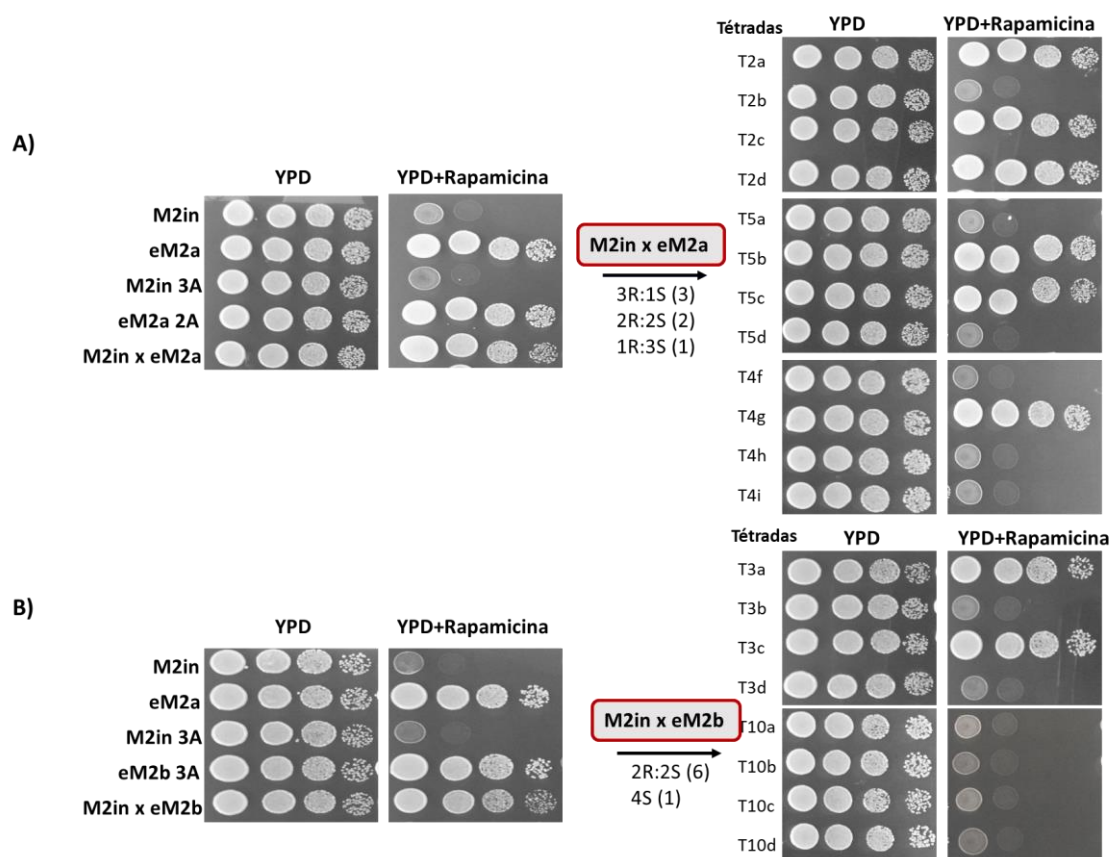
Para intentar determinar los cambios inducidos por la rapamicina se procedió a estudiar las posibles bases genéticas de la mayor tolerancia a rapamicina de las cepas evolucionadas. Dado que las cepas vínicas suelen ser diploides, la o las mutaciones producidas podrían encontrarse en homocigosis o en heterocigosis. Para investigar este aspecto se procedió a analizar el crecimiento de derivados de esporulación de la cepa original M2in y de las cepas evolucionadas 200 generaciones eM2a y M2b, mediante goteos en placas de YPD suplementado con rapamicina y con MSX. En la Figura 42 se muestran los goteos realizados del proceso de esporulación realizado con las cepas M2in, eM2a y eM2b. La obtención de 4 esporas viables indica que la cepa M2in era diploide. Las tétradas se indican con la letra T seguida del número de la tétrada analizada y las letras indican la espora (a, b, c o d). Tal y como cabía esperar, las esporas procedentes de M2in son sensibles a la rapamicina al igual que su cepa parental. Se analizaron 11 tétradas de cada una de las cepas evolucionadas y todas las esporas analizadas mostraron una mayor tolerancia a rapamicina indicando que las cepas eM2a y eM2b son homocigotas para la mutación, o se debe a una herencia citosólica (priónica o mitocondrial), ver más adelante. En la Figura 42 también se muestra que no hay diferencias respecto al inhibidor MSX y que la tolerancia de M2in y BQS252 frente a rapamicina sigue siendo menor que la de la cepa EC1118. La resistencia observada en todas las esporas de las tétradas analizadas indica que las mutaciones inducidas durante la evolución dirigida se encuentran en homocigosis.



**Figura 42.** Análisis del crecimiento de derivados de esporulación de las cepas M2in, eM2a y eM2b transcurridas 200 generaciones mediante goteos realizados en medio YPD en presencia de rapamicina (100 nM) o MSX (2 mM). Se añade como control de tolerancia a rapamicina de las cepas EC1118 y BQS252.

Una vez observado que la posible mutación se encuentra en homocigosis en las dos cepas evolucionadas eM2a y eM2b se planteó la obtención de híbridos entre la cepa M2in y las cepas evolucionadas, con la finalidad de investigar si las mutaciones son recesivas o dominantes y, en función de las proporciones obtenidas, determinar si son monogénicas o están implicadas varios genes. El crecimiento de los derivados de esporulación obtenidos a partir de ambos híbridos se analizó mediante goteos en placas de medio completo YPD en presencia de rapamicina, que se muestran en la Figura 43.

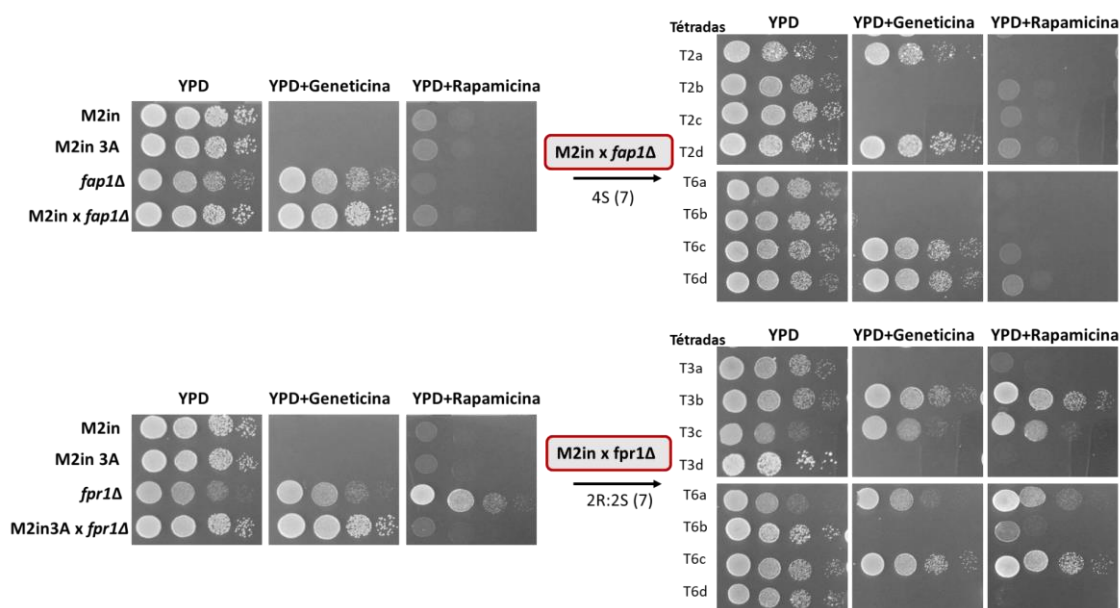
Tanto el híbrido M2in x eM2a como el híbrido M2in x eM2b son más resistentes a rapamicina indicando que la mutación producida es dominante en ambos casos. La segregación obtenida por esporulación del híbrido M2in x eM2a se aleja de la esperada 2R:2S para un carácter monogénico, sugiriendo que el fenotipo de eM2a es consecuencia de mutaciones en varios genes. Sin embargo, en el caso de eM2b, la segregación mayoritaria 2R:2S obtenida a partir el híbrido M2in x eM2b sugiere que la mutación producida es monogénica. La aparición de una única tétrada (T10) en la que las cuatro esporas analizadas son sensibles a rapamicina no puede explicarse ya que se ha demostrado que el híbrido es dominante y, por tanto, si la mutación sigue una herencia mendeliana, deberían aparecer al menos dos esporas resistentes a rapamicina.



**Figura 43.** Fenotipo de los derivados de esporulación obtenidos de los híbridos M2in x eM2a (A) y M2in x eM2b (B) en medio completo YPD en presencia de rapamicina (100 nM). Para el primer híbrido se analizaron 6 tétradas diferentes y 7 para el segundo, cuyas segregaciones se indican en cada panel debajo del cruce realizado. Las esporas procedentes de la misma tétrada se indican con el mismo número y diferente letra. Se muestra un ejemplo de cada segregación obtenida. Las tétradas se indican con la letra T seguida del número de la tétrada analizada y las letras indican la espota (a, b, c o d).

Una vez determinado que las mutaciones producidas en las cepas evolucionadas son homocigotas y dominantes, se investigaron posibles mecanismos afectados por ellas que podrían explicar su fenotipo. Una primera opción sería que el aumento de la tolerancia a rapamicina fuera consecuencia de una mutación en el gen responsable de interaccionar con el inhibidor. En el caso concreto del efecto de la rapamicina, el gen *FPR1* y el gen *FAP1* son de gran importancia puesto que son responsables de su capacidad de inhibir a TORC1. *FPR1*, ortólogo de FKBP12 en humanos, codifica una peptidil-prolil isomerasa encargada de unirse a la rapamicina formando el complejo Fpr1p-Rapamicina (Koltin et al., 2015; Lorenz y Heitman, 1995). Posteriormente, ese complejo se une a TORC1 produciendo su inactivación. El mutante *fpr1Δ* presenta una mayor tolerancia a rapamicina, puesto que ésta no puede unirse a TORC1. *FAP1* confiere resistencia a rapamicina ya que compite con ésta por la unión a Fpr1p (Kunz et al., 2000). Por tanto, un mutante *fap1Δ* es más sensible a rapamicina. Se procedió a realizar cruces entre las cepas M2in, eM2a y eM2b con las cepas BY4742 *fpr1Δ* y BY4742 *fap1Δ* con el objetivo de determinar si la mayor tolerancia a rapamicina era consecuencia de una mutación en dichos genes. Los resultados de crecimiento en presencia de rapamicina de los derivados del proceso de esporulación de los híbridos obtenidos se muestran en la Figura 44, la Figura 45 y la Figura 46. En todas ellas se muestra la tolerancia a rapamicina del mutante *fpr1Δ* y la sensibilidad del mutante de *fap1Δ*, al igual que el crecimiento de ambos en presencia de genética. Para cada cruce se analizaron 7 tétradas diferentes completas, cuya segregación se muestra en cada figura debajo del cruce realizado. En todos los cruces realizados, el marcador *kanMX*, indicativo de la delección del gen *FPR1* o *FAP1*, presenta una segregación 2R:2S (2 esporas resistentes: 2 esporas sensibles a genética), tal y como está descrito (Wach et al., 1994).

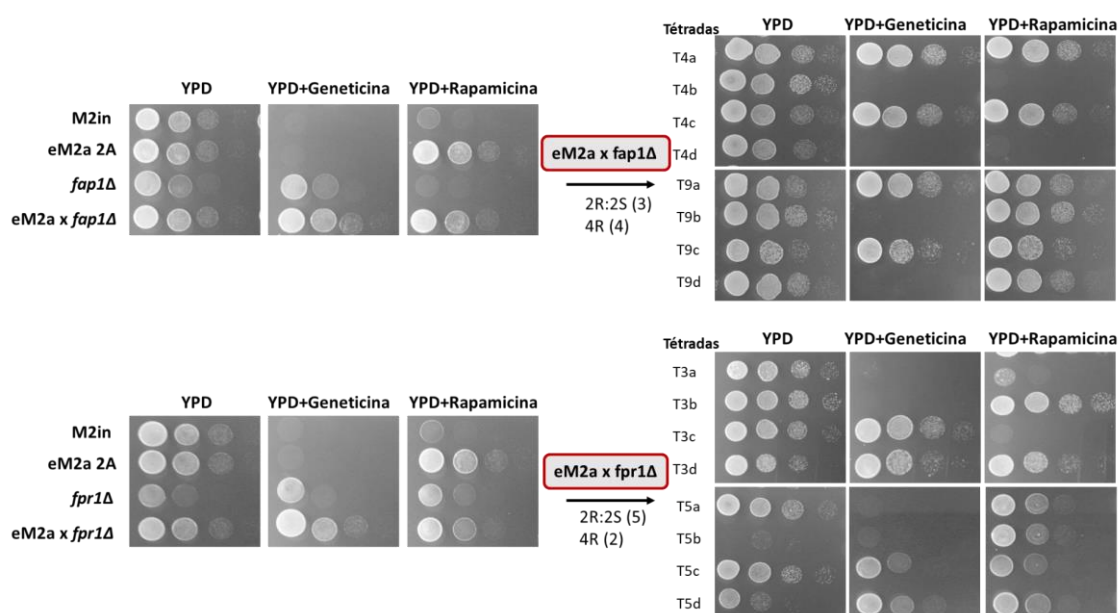
En la Figura 44, se muestra el crecimiento de los híbridos obtenidos M2in x *fap1Δ* y M2in x *fpr1Δ* y de los derivados de esporulación correspondientes. Ambos híbridos son sensibles a rapamicina al igual que las cepas parentales M2in y *fap1Δ*, a diferencia del parental *fpr1Δ*, que es más resistente. La segregación observada para el híbrido M2in x *fap1Δ* es 4 esporas sensibles, dos de las cuales presentan la delección *fap1Δ* y las otras dos que no la presentan pero proceden de M2in, de ahí su elevada sensibilidad. Respecto a *FPR1*, las siete tétradas analizadas presentan una segregación 2R:2S. Las dos esporas resistentes son las que presentan la delección de *FPR1* mientras que las sensibles portan el alelo silvestre de M2in.



**Figura 44.** Fenotipo de crecimiento de los derivados de esporulación obtenidos de los híbridos M2in x *fap1Δ* y M2in x *fpr1Δ*. Goteos en medio completo YPD en presencia de geneticina (200 mg/L) o rapamicina (100 nM). Para cada cruce se analizaron 7 tétradas diferentes, cuya segregación se muestra en cada figura debajo del cruce realizado. Las esporas procedentes de la misma tétrada se indican con el mismo número y diferente letra. Se muestran dos ejemplos de la segregación obtenida para cada cruce. Las tétradas se indican con la letra T seguida del número de la tétrada analizada y las letras indican la espota (a, b, c o d).

Una vez observado el comportamiento de la segregación de la delección de los genes anteriormente comentados en la cepa original, se procedió a analizar los híbridos de las cepas procedentes del experimento de evolución dirigida. En la Figura 45 se muestran los goteos realizados con los híbridos procedentes de la cepa eM2a y las esporas correspondientes. Se muestran dos ejemplos de la segregación obtenida para cada cruce. La segregación del híbrido eM2a x *fap1Δ* es tres tétradas 2R:2S y cuatro tétradas 4R, resultado muy diferente de la segregación obtenida para el mismo cruce pero con la cepa original M2in (4S). Las esporas T9b y T9d presentan la mutación de eM2a ya que no son capaces de crecer en presencia de geneticina pero son resistentes a rapamicina. Ello indicaría que el fenotipo observado para eM2a no es consecuencia de una mutación en el gen *FAP1*. Por otra parte, la segregación de las tétradas procedentes del híbrido eM2a x *fpr1Δ* tampoco puede explicarse como consecuencia de una única mutación en el gen *FPR1* ya que hay dos tétradas cuyas cuatro esporas son resistentes a rapamicina.

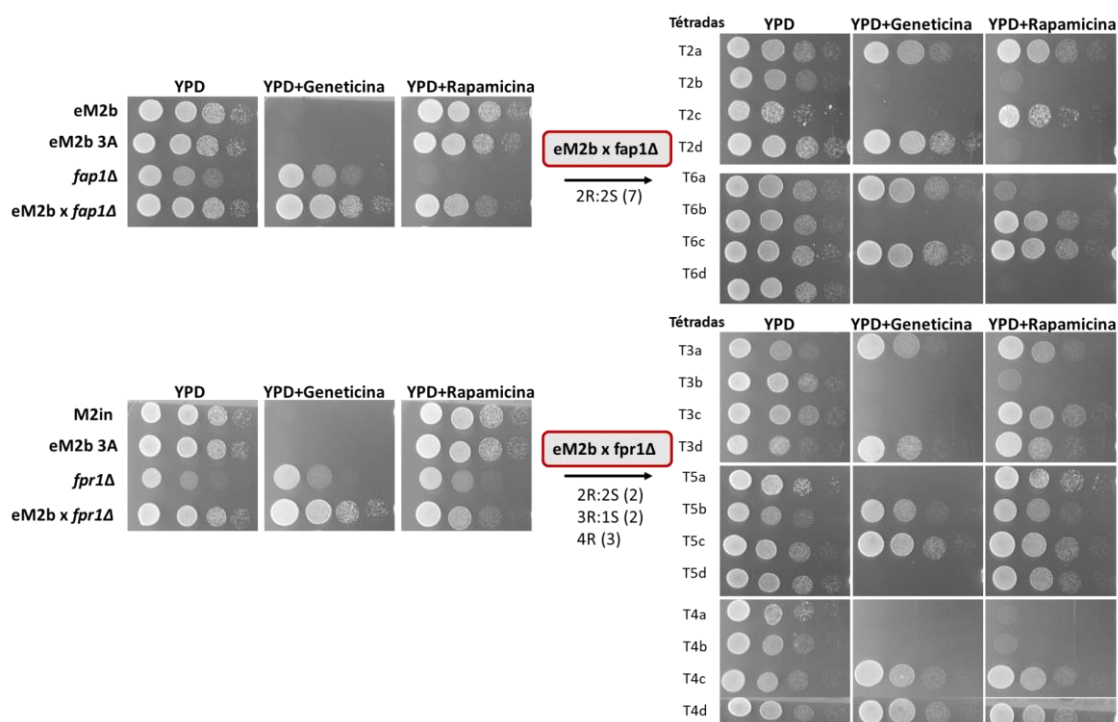




**Figura 45.** Fenotipo de crecimiento de los derivados de esporulación obtenidos de los híbridos *eM2a x fap1Δ* y *eM2a x fpr1Δ*. Goteos en medio completo YPD en presencia de geneticina (200 mg/L) o rapamicina (100 nM). Para cada cruce se analizaron 7 tétradas diferentes, cuya segregación se muestra en cada figura debajo del cruce realizado. Las esporas procedentes de la misma tétrada se indican con el mismo número y diferente letra. Se muestra un ejemplo de cada segregación obtenida. Las tétradas se indican con la letra T seguida del número de la tétrada analizada y las letras indican la espota (a, b, c o d).

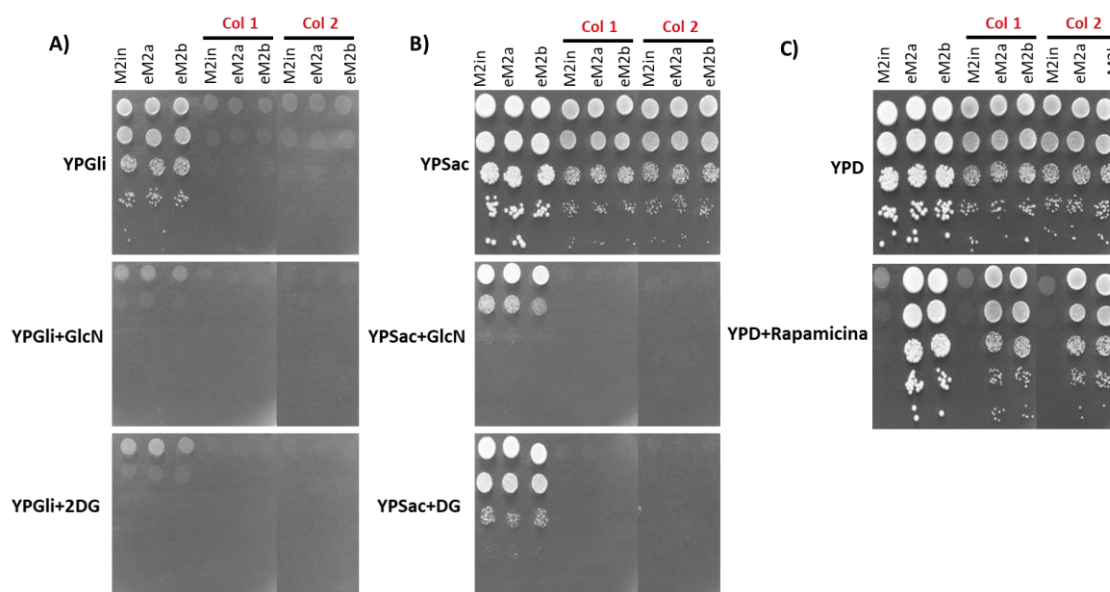
Finalmente, los resultados obtenidos a partir de los híbridos *eM2b x fap1Δ* y *eM2b x fpr1Δ* se muestran en la Figura 46. La segregación obtenida de ambos híbridos no puede explicarse por una única mutación en los genes *FAP1* y *FPR1*. Las esporas T2b y T2c no pueden crecer en presencia de geneticina indicando que no presentan el gen *FAP1* delecionado. El fenotipo de ambas esporas es totalmente diferente en presencia de rapamicina indicando que *FAP1* no interacciona con la mutación producida en *eM2b*. Se observa el mismo fenotipo para las esporas T6b y T6d. La aparición de cuatro esporas procedentes de la misma tétrada (T4) resistentes a rapamicina indica que la mutación producida en *eM2b* no afecta a *FPR1*.





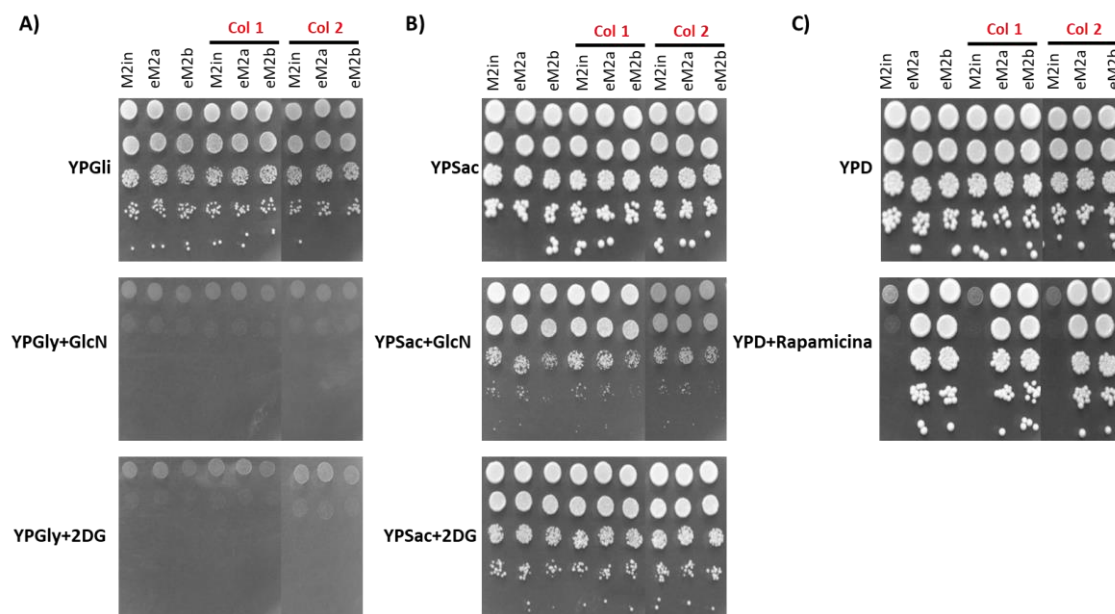
**Figura 46.** Fenotipo de crecimiento de los derivados de esporulación obtenidos de los híbridos *eM2b x fap1Δ* y *eM2b x fpr1Δ*. Goteos en medio completo YPD en presencia de geneticina (200 mg/L) o rapamicina (100 nM). Para cada cruce se analizaron 7 tétradas diferentes, cuya segregación se muestra en cada figura debajo del cruce realizado. Las esporas procedentes de la misma tétrada se indican con el mismo número y diferente letra. Se muestra un ejemplo de cada segregación obtenida. Las tétradas se indican con la letra T seguida del número de la tétrada analizada y las letras indican la espota (a, b, c o d).

Los experimentos mostrados han partido de la suposición de que la mutación causante del fenotipo de resistencia a rapamicina de las cepas evolucionadas *eM2a* y *eM2b* afectan a genes cromosómicos pero también puede ser una mutación mitocondrial o debida a priones. Para descartar una posible mutación mitocondrial, las cepas *M2in*, *eM2a* y *eM2b* se cultivaron en presencia de bromuro de etidio con el objetivo de obtener mutantes *petite* que presentasen la mitocondria dañada y, por tanto, no pudiesen crecer en fuentes de carbono no fermentables, como el glicerol. Si los cambios producidos en las cepas evolucionadas fueran como consecuencia de una mutación en el DNA mitocondrial, la mayor tolerancia a rapamicina debería revertirse. En la Figura 47 se muestran los goteos realizados con los mutantes *petite* de las cepas procedentes de la evolución dirigida. La imposibilidad de crecer en medio con glicerol como única fuente de carbono confirma que son mutantes *petite* (panel A). El fenotipo es menos acusado en presencia de sacarosa como fuente de carbono. En el panel C se sigue observando la mayor tolerancia frente a rapamicina de las cepas evolucionadas. Las colonias *petite* presentan el mismo fenotipo frente a rapamicina que las cepas evolucionadas indicando que la elevada tolerancia frente a rapamicina de las cepas evolucionadas no se debe a una mutación mitocondrial.



**Figura 47.** Efecto en el crecimiento de las cepas evolucionadas frente a rapamicina tratadas con bromuro de etidio (color rojo) (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en diversos medios. Se analizan dos colonias de M2in, eM2a y eM2b. Goteos en medio no fermentable YPGlicerol (YPGli) (A) y en medio con fuente de carbono YPSacarosa (YPSac) (B) en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Goteos de las colonias analizadas en los panels anteriores en medio completo YPD en presencia de rapamicina (100 nM) (C). Col: colonia.

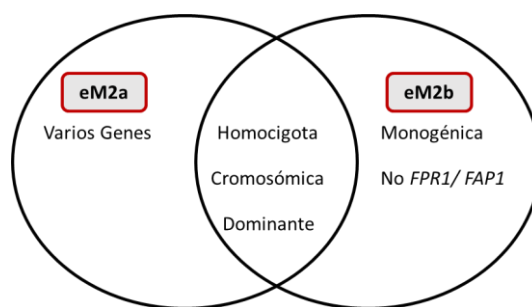
Descartada una posible mutación en el genoma mitocondrial, se planteó la posibilidad de que la tolerancia a rapamicina de las cepas evolucionadas fuera como consecuencia de un prión. En hongos hay una gran diversidad de priones que pueden explicar multitud de fenotipos como consecuencia de su propagación. Por ejemplo, el prion  $[\text{GAR}^+]$  (*resistant to Glucose-Associated Repression*) permite utilizar otras fuentes de carbono en presencia de glucosa por lo que las cepas que los presentan son resistentes a 2-desoxiglucosa. Aunque inicialmente se pensó que los priones eran un fenotipo procedente del cultivo de laboratorio, Halfmann et al., (2012) demostraron que las cepas silvestres también presentan priones que les permiten adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. Dado que la mayoría de los priones son proteínas mal plegadas de tipo amiloide, con capacidad de autopropagación de la estructura alterada, el tratamiento con cloruro de guanidinio a bajas concentraciones permite eliminar los priones como consecuencia de su actividad desnaturalizante (Eaglestone et al., 2002; Ferreira et al., 2001). Para discernir si la tolerancia a rapamicina adquirida de las cepas evolucionadas en presencia de dicho compuesto era como consecuencia de un prion se cultivaron en presencia de cloruro de guanidinio varias generaciones y se analizaron dos colonias curadas de priones de cada una de las cepas evolucionadas y también de la cepa M2in. Los resultados del análisis de crecimiento mediante goteos en diferentes medios y condiciones se muestran en la Figura 48. El análisis se realizó en medio con glicerol como única fuente de carbono alternativa y también en presencia de análogos estructurales de la glucosa (glucosamina GlcN, y 2-desoxiglucosa, 2DG) para determinar si la identidad del prión era  $[\text{GAR}^+]$ , el cual desreprime la represión por glucosa permitiendo crecer en una fuente de carbono alternativa como es el glicerol incluso en presencia de glucosa. La sacarosa disminuye el efecto producido por los análogos de la glucosa, panel B. Se comprobó la tolerancia frente a rapamicina para determinar si permanecía tras el tratamiento, panel C.



**Figura 48.** Efecto del crecimiento de las cepas evolucionadas frente a rapamicina junto con M2in tratadas con cloruro de guanidinio (GdnCl) (color rojo). Los goteos se realizaron en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200  $\mu$ g/mL) en medio YPGli (A) o medio YPSac (B). Goteos realizados en medio completo YPD en presencia de rapamicina (100 nM) (C). Col: colonias.

En el panel A y B de la Figura 48 puede observarse que el tratamiento con GdnCl no modifica el fenotipo de las cepas evolucionadas ni de la cepa M2in. Ambas colonias analizadas presentan la misma tolerancia a rapamicina que sus cepas parentales, indicando que la presencia de priones no puede explicar el fenotipo observado de las cepas evolucionadas en presencia de rapamicina. La elevada tolerancia a rapamicina de las cepas evolucionadas no se debe a un prión amiloide.

En la Figura 49 se muestra un resumen de los rasgos en común y las diferencias entre las dos réplicas de las cepas evolucionadas eM2a y eM2b. En ambas réplicas, las mutaciones producidas se encuentran en el DNA genómico posiblemente, son homocigotas y dominantes. Los goteos en placa han podido determinar que para eM2a las mutaciones deben haberse producido en varios genes, no pudiendo descartar la implicación de *FAP1* o *FPR1*; mientras que para eM2b la mutación es monogénica y no se debe a los genes *FAP1* y *FPR1*. Li et al.,(2019) también realizaron una evolución dirigida frente a rapamicina pero en placas de YPD donde la mayor parte de aislados analizados presentaban mutaciones en *TOR1* y *FPR1* que causaban la mayor tolerancia a rapamicina.



**Figura 49.** Bases genéticas de las mutaciones producidas como consecuencia del crecimiento reiterado en rapamicina de la cepa vínica M2.

La evolución dirigida de la cepa M2 en presencia de rapamicina se planteó inicialmente, no para obtener una cepa más tolerante a rapamicina, sino con el objetivo principal de conseguir fenotipos de interés en vinificación derivados de potenciales efectos sobre la regulación de la ruta TOR. Los análisis realizados a lo largo de las distintas generaciones junto con las diferentes colonias analizadas transcurridas las 200 generaciones totales del experimento indican que la metodología realizada durante la evolución dirigida es adecuada puesto que se ha aumentado la resistencia a rapamicina, si bien es cierto que la tolerancia a rapamicina ya se observaba a las 50 generaciones, indicando que el número de generaciones transcurridas podría haberse disminuido.

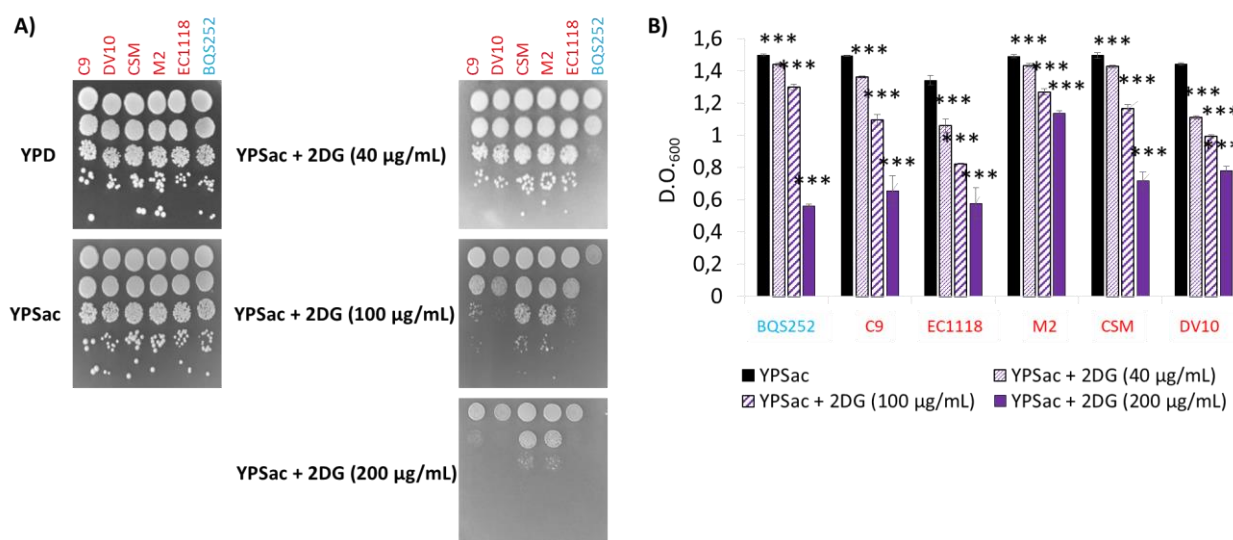
Aunque la secuenciación del genoma hubiera proporcionado más información relacionada con las mutaciones producidas como consecuencia del crecimiento reiterado en presencia de rapamicina, el análisis fenotípico de derivados de esporulación sigue siendo una herramienta muy útil para discernir las bases genéticas de las mutaciones. Además, se ha podido determinar que, aunque las condiciones eran idénticas para las cepas eM2a y eM2b, ambas no han evolucionado de la misma manera, a pesar de presentar el mismo fenotipo. La adaptación diferente al crecimiento en presencia de rapamicina demuestra la plasticidad que presentan las cepas vínicas para adaptarse a condiciones adversas.

### 3.2. Evolución dirigida de la cepa EC1118 en presencia de 2-desoxiglucosa

#### 3.2.1. Selección de la cepa EC1118

Una vez analizadas las cepas obtenidas por evolución dirigida frente a rapamicina, se planteó la realización de otro experimento de evolución dirigida en presencia de un inhibidor químico cuya diana sea una ruta distinta. Tal como se ha comentado en el apartado 1.3 de este capítulo, de las cuatro cepas de referencia (CSM, M2, DV10 y EC1118) existen dos grupos de cepas vínicas cuyo fenotipo es muy similar, CSM/M2 y EC1118/DV10. Como ya se había realizado una evolución con la cepa M2, más sensible a rapamicina, se propuso realizar la evolución dirigida con una de las cepas del otro grupo, EC1118 o DV10, que son más sensibles a 2-desoxiglucosa (Figura 50 panel A). En este caso, el objetivo de la evolución era obtener cepas desreprimidas para el uso de fuentes de carbono alternativas a la glucosa que serían capaces de utilizar más eficientemente otros hidratos de carbono mientras que la producción de etanol podría verse disminuida debido a una mayor respiración obteniéndose vinos con menos contenido alcohólico. La selección de 2DG frente a la glucosamina reside en que la 2DG puede ser fosforilada, paso esencial para la señalización de glucosa, con lo podría identificar alteraciones potenciales en una mayor porción de la ruta de señalización por fuente de carbono.

Se analizó la tolerancia frente a la 2DG mediante estudios de crecimiento por goteos en placa y curvas de crecimiento en medio YPSacarosa de las cinco cepas vínicas seleccionadas inicialmente. Los resultados se muestran en la Figura 50. En el panel A puede observarse la menor tolerancia frente a cualquier concentración de 2DG de la cepa de laboratorio BQS252 respecto de las cepas vínicas analizadas, dejando patente la gran diferencia entre estos dos grupos de cepas. La concordancia de fenotipos entre la cepa CSM y M2 y, por otro lado, EC1118 y DV10 vuelve a mostrarse frente a 2DG. En este caso, las cepas vínicas CSM y M2 son más resistentes a 2DG que las cepas EC1118 y DV10. En el panel B de la misma figura se muestra la D. O.<sub>600</sub> alcanzada para cada una de las cepas tras un crecimiento en líquido en los medios indicados, donde se observa que incluso la concentración más baja analizada de 2DG (40 µg/mL) causa un crecimiento menor, particularmente en EC1118 y DV10. Tanto en los experimentos de los goteos como en las curvas de crecimiento se muestra que la concentración de 200 µg/mL de 2DG provoca un déficit de crecimiento muy elevado por lo que se descartó dicha concentración para realizar la evolución dirigida y se seleccionó la concentración de 100 µg/mL. Al ser la cepa EC1118 una de las más sensibles a 2DG tanto en placa como en medio líquido, se escogió para el nuevo experimento de evolución dirigida en presencia de 2DG.

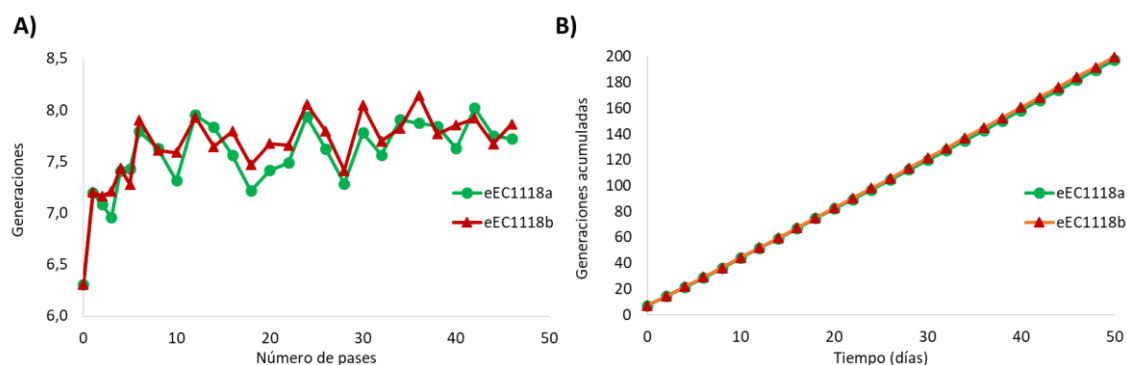


**Figura 50.** Efecto de la 2-desoxiglucosa en el crecimiento analizado mediante goteos o en medio líquido en YPSacarosa (YPSac) de diferentes cepas vínicas (rojo) y la cepa de laboratorio BQS252 (azul). Goteos en medio completo YPD y medio YPSac de diferentes cepas vínicas en presencia de 2DG a diferentes concentraciones (A). Se muestran las medias de los valores finales de la D.O.<sub>600</sub> alcanzados después de 24 horas de crecimiento y su desviación típica en medio YPSac en presencia de diversas concentraciones de 2DG (B). Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias (\* P-valor ≤ 0.05; \*\* P-valor ≤ 0.01; \*\*\* P-valor ≤ 0.005). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

La evolución dirigida de la cepa EC1118 en presencia de 2DG se realizó en medio YPSac, que presenta sacarosa como fuente de carbono, que permite la discriminación de la sensibilidad a 2DG, promoviendo un crecimiento mayor que otras fuentes no fermentables como el glicerol.

### 3.2.2. Seguimiento de la evolución dirigida

Inicialmente se utilizó una única colonia de EC1118 (EC1118in) para inocular dos matraces con 25 mL de medio YPSac con 2DG. Se realizaron dos experimentos en paralelo de evolución dirigida nombrados como eEC1118a y eEC1118b. Los pases se realizaron cada 48 horas inoculando el nuevo medio a una D.O.<sub>600</sub> de 0.1. La determinación del número de generaciones se realizó a partir de los datos obtenidos de la D.O.<sub>600</sub> de cada uno de los pases realizados, datos que se muestran en la Figura 51. Igual que con la evolución dirigida de la cepa M2 frente a rapamicina, la comprobación de contaminaciones se realizó mediante observación bajo el microscopio óptico (datos no mostrados) y por siembra en medio YPSac más 2DG. Conforme la evolución dirigida avanzaba, el tamaño de las colonias obtenidas después de cada siembra iba en aumento indicando la adquisición de una mayor tolerancia al compuesto. A diferencia de lo observado en la evolución dirigida de la cepa M2 en presencia de rapamicina, en la que se produjo un salto en el número de generaciones en los primeros pases, en esta evolución dirigida el número de generaciones producidas en cada pase va aumentando progresivamente, como muestra el panel B de la Figura 51.



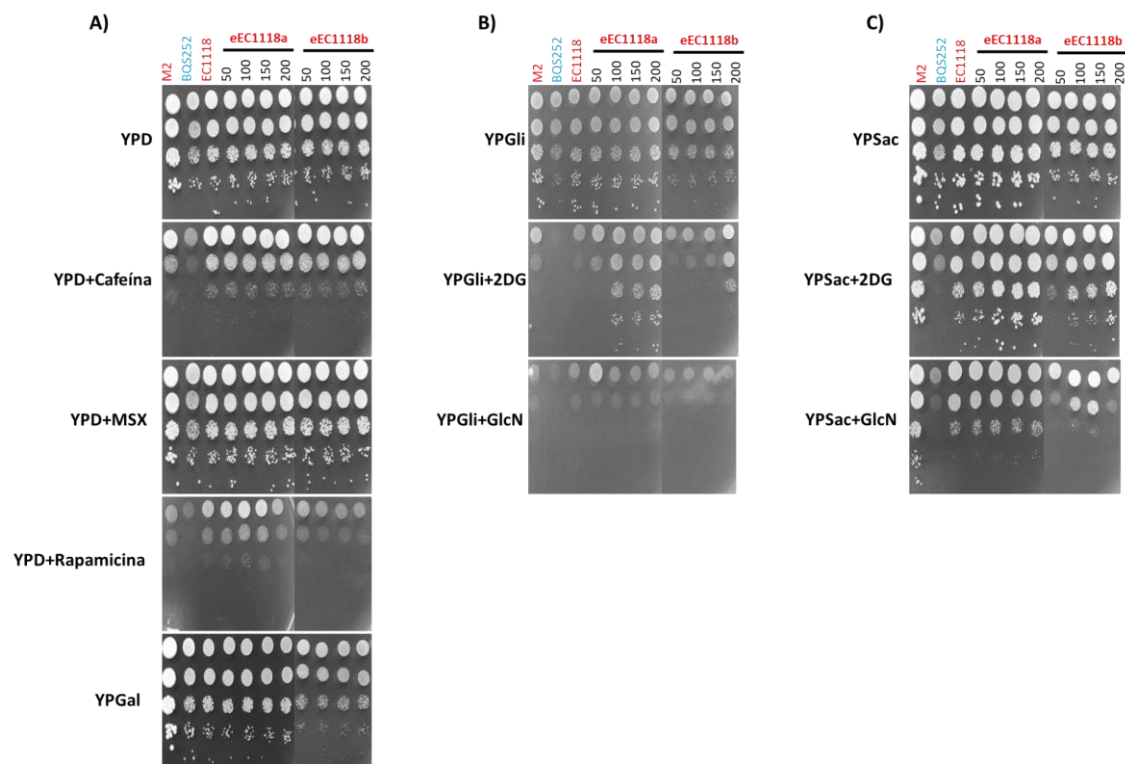
**Figura 51.** Seguimiento de la evolución dirigida de la cepa EC1118 en medio YPSacarosa en presencia de 2DG. Generaciones obtenidas en cada uno de los pases realizados durante la evolución dirigida tanto de la réplica a como de la réplica b (A). Generaciones acumuladas a lo largo de la evolución dirigida (B).

### 3.2.3. Análisis de las distintas generaciones obtenidas durante la evolución dirigida frente a 2DG

Durante la evolución dirigida se recogieron muestras transcurridas 50, 100, 150 y 200 generaciones y se analizaron mediante goteos en placa frente a diversos inhibidores químicos, Figura 52. En el panel A se muestra tanto eEC1118a como eEC1118b a distintas generaciones en medio competo YPD en presencia de cafeína, MSX y rapamicina y frente a YPGal. Se analizaron frente a dichos inhibidores para poder discernir la ruta metabólica implicada en la mayor tolerancia frente a la 2DG; así como la galactosa para conocer si el uso de fuentes de carbono alternativas se había modificado. No hay variación en cuanto a la sensibilidad a cafeína y MSX, ni tampoco frente a rapamicina o durante el crecimiento en galactosa para la colonia eEC1118a. Sin embargo, las colonias analizadas procedentes de eEC1118b parecen tener una sensibilidad ligeramente mayor frente a rapamicina y un menor crecimiento en presencia de galactosa como única fuente de carbono, lo cual va en contra de lo esperado. En los paneles B y C, se muestra el fenotipo de las cepas evolucionadas frente a los análogos de la glucosa 2DG y GlcN. En presencia de glicerol (panel B), la cepa eEC1118b presenta un defecto de crecimiento en glicerol desde las 50 generaciones, similar a lo observado en galactosa. El efecto de la GlcN es muy drástico en estas condiciones y no se aprecian diferencias. En cuanto



al uso de la 2DG, se observa un salto en la tolerancia frente a dicho compuesto a 100 generaciones en la réplica a de la evolución, mientras que en la réplica b se hace más patente a las 200 generaciones. Curiosamente el efecto en sacarosa (panel C), medio donde se ha realizado la evolución, el aumento de la tolerancia es más sutil. En la réplica a de la evolución dirigida la mejora es apenas perceptible; mientras que para la réplica b se observa un incremento gradual en la tolerancia a 2DG, aunque hay una mayor sensibilidad inicial.

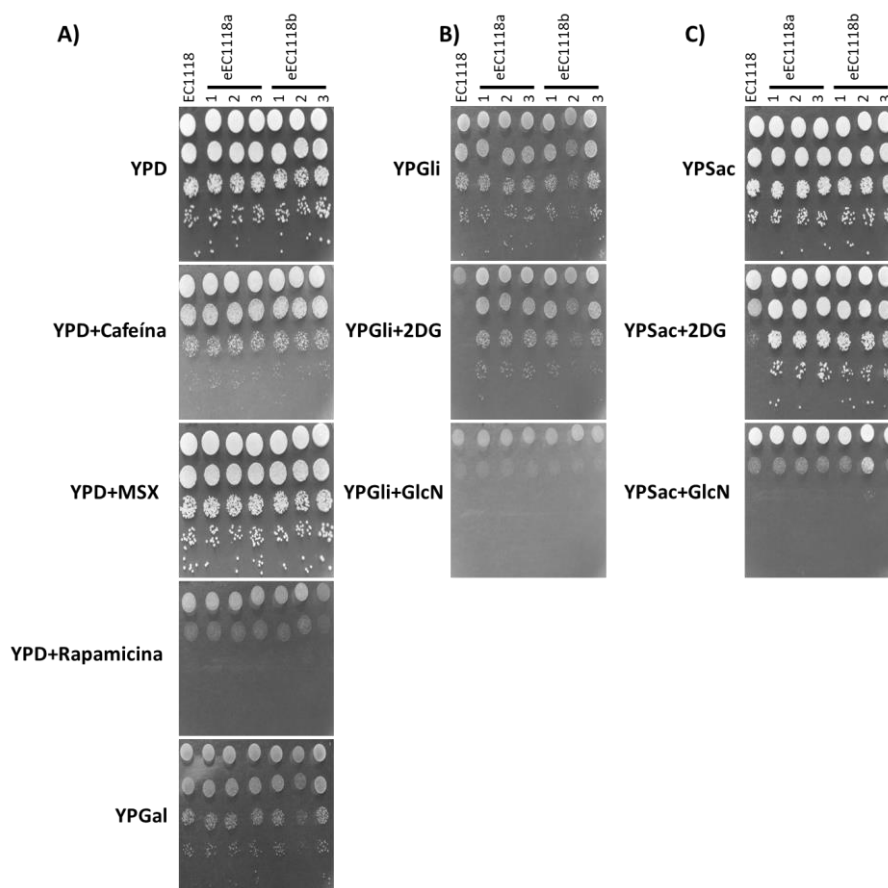


**Figura 52.** Efecto de la evolución dirigida frente a 2-desoxiglucosa en las diferentes generaciones obtenidas frente a diversos inhibidores químicos. Goteos realizados en medio completo YPD con cafeína (10 mM), MSX (1mM) y rapamicina (100 nM) y en medio YPGal (A). Goteos realizados en medio YPGli (B) o YPSac (C) en presencia de los análogos estructurales de la glucosa 2-desoxiglucosa (2DG, 100 µg/mL) y glucosamina (GlcN, 0.05 %). En todos los paneles se han analizado las cepas evolucionadas frente a 2DG a 50, 100, 150 y 200 generaciones de eEC118a y eEC118b.

### 3.2.4. Análisis de las distintas colonias obtenidas de las cepas evolucionadas frente a 2DG durante 200 generaciones

Transcurridas 200 generaciones, se seleccionaron 3 colonias de cada una de las réplicas de la evolución dirigida con el objetivo de seleccionar aquellas cepas evolucionadas con fenotipos de interés derivados de su resistencia a 2DG. Se realizaron goteos tanto en medio completo YPD como en medio YPGli e YPSac, Figura 53. No se observan diferencias de crecimiento entre las diferentes colonias analizadas frente a cafeína o MSX pero sí frente a rapamicina y galactosa. La colonia 2 de eEC118b es más resistente a rapamicina pero su crecimiento se ve afectado en presencia de galactosa. Tampoco se observan diferencias de crecimiento entre las diferentes colonias analizadas en presencia de 2DG o glucosamina independientemente del medio utilizado YPGli o YPSac. La mayor tolerancia a 2DG de todas las cepas evolucionadas respecto a la cepa parental EC118in sugiere que el crecimiento reiterativo en presencia de 2DG ha producido un cambio en las cepas evolucionadas. Sin embargo, las cepas

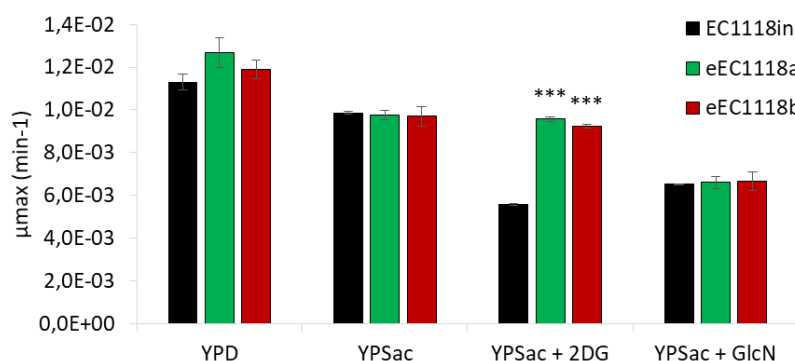
evolucionadas son igual de resistentes a glucosamina que la cepa parental, siendo la glucosamina y la 2DG ambos análogos estructurales. Por lo tanto, los cambios producidos deben ser específicos para 2DG. La colonia 2 de eEC1118b presenta un crecimiento menor en presencia de 2DG en YPGli pero un mayor crecimiento en presencia de glucosamina.



**Figura 53.** Análisis de crecimiento de las distintas colonias aisladas de las cepas evolucionadas eEC1118a y eEC1118 a 200 generaciones. Goteos realizados en medio completo YPD con caféina (10 mM), MSX (1mM) y rapamicina (100 nM) y en medio YPGal (A). Goteos realizados en medio YPGli (B) o YPSac (C), en presencia de los análogos estructurales de la glucosa 2DG (100 µg/mL) y glucosamina (GlcN, 0.05 %). En todos los paneles se han analizado tres colonias procedentes de las cepas evolucionadas a 200 generaciones eEC1118a y eEC1118b.

Para corroborar que el mayor crecimiento en presencia de 2DG también se producía en medio líquido se realizaron curvas de crecimiento con EC1118in, eEC1118a (colonia 1) y eEC1118b (colonia 2) y se determinó la velocidad de crecimiento máxima obtenida, cuyos resultados se muestran en la Figura 54. Las cepas evolucionadas presentan un crecimiento mayor estadísticamente significativo en presencia de 2DG indicando su mayor tolerancia al compuesto. No existen diferencias significativas ni en presencia de glucosamina ni en el crecimiento en YPSacarosa como fuente de carbono. Estos resultados vuelven a dejar patente que los cambios producidos como consecuencia del crecimiento reiterativo en presencia de 2DG son específicos para 2DG y no para la glucosamina.



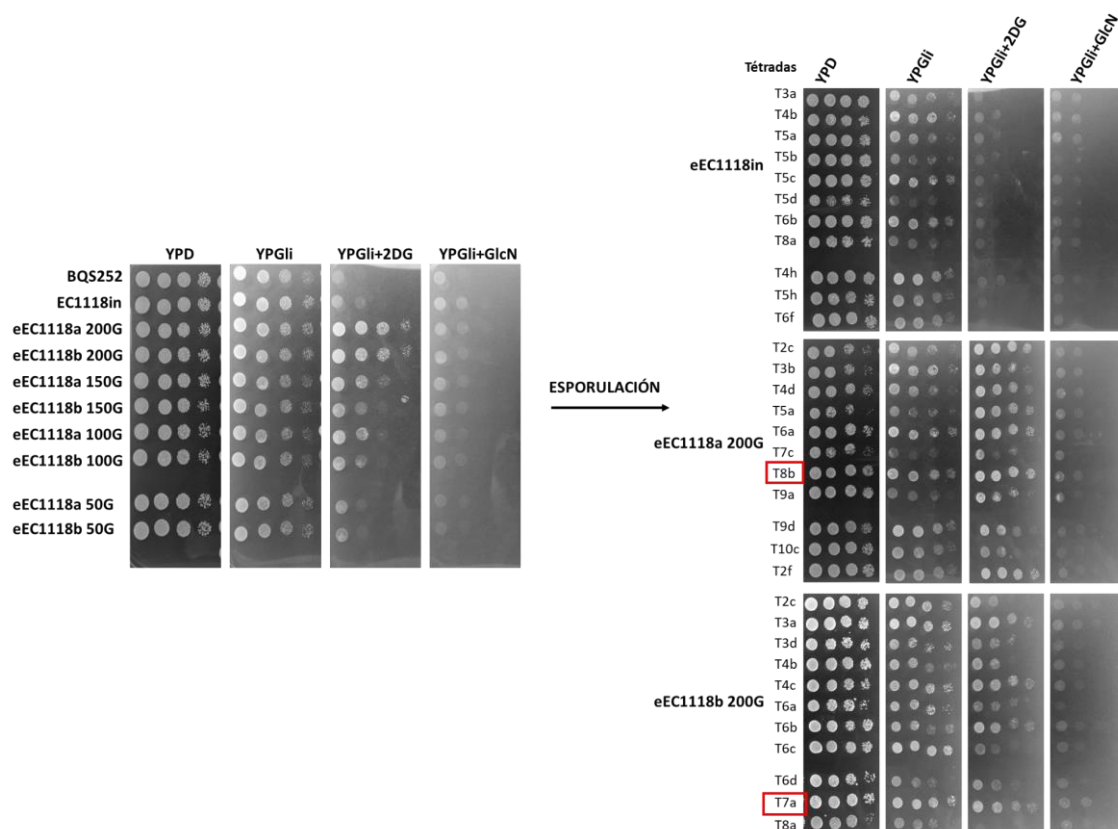


**Figura 54.** Análisis de las cepas evolucionadas en presencia de 2DG a 200 generaciones. Velocidad de crecimiento máxima procedente del crecimiento de las cepas evolucionadas en presencia de 2DG transcurridas 200 generaciones en medio completo YPD e YPSac más 2-desoxiglucosa (2DG, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) o glucosamina (GlcN, 0.05 %). El análisis estadístico se realiza respecto a la cepa EC1118in en cada medio analizado. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ).

### 3.2.5. Efecto de la adaptación frente a 2DG en condiciones de vinificación

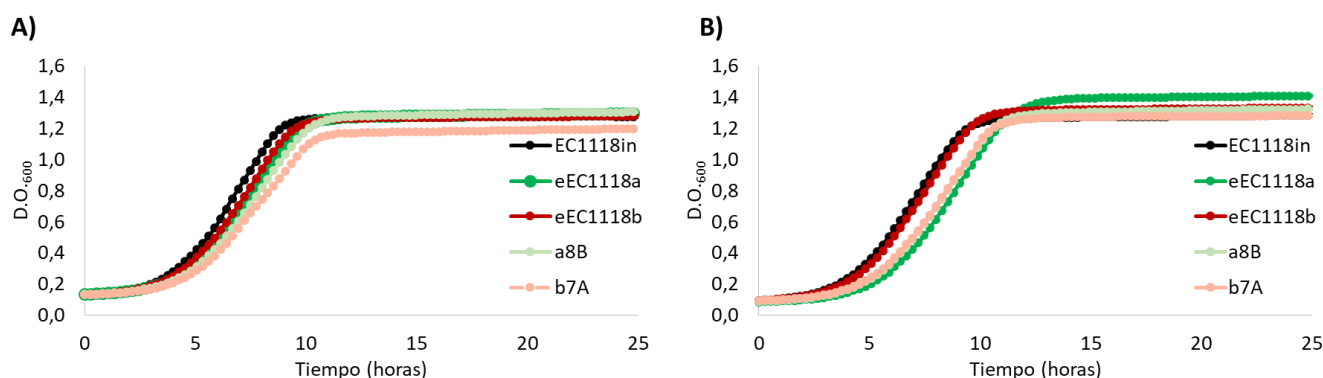
Igual que para la evolución frente a rapamicina previamente descrita, se procedió a estudiar las bases genéticas de la mayor tolerancia a 2DG, para lo que se llevaron a cabo experimentos de esporulación y análisis de los derivados tanto con la cepa EC1118in como las cepas evolucionadas eEC1118a y eEC1118b. Únicamente el 2.5 % de las tétradas analizadas procedentes de una misma asca tanto de la cepa eEC1118in como de la cepa eEC1118b dieron lugar a cuatro esporas viables mientras que no se obtuvo ninguna para la cepa eEC1118a. La baja viabilidad de las cuatro esporas procedentes de una misma asca dificultó la determinación de las bases genéticas de los cambios producidos durante la evolución. La baja viabilidad de las esporas procedentes de cepas vínicas ya ha sido previamente descrita (Johnston et al., 2000).

Como consecuencia, se optó por analizar el fenotipo de las esporas que sí fueron viables, mostrándose los resultados en la Figura 55. Las esporas procedentes de la cepa inicial eEC1118in son sensibles a 2DG y a glucosamina, mientras que las cepas evolucionadas son más tolerantes únicamente a 2DG. En la evolución dirigida de la cepa M2, todas las esporas analizadas fueron más tolerantes a rapamicina (Figura 42). Sin embargo, en los derivados de esporulación procedentes de eEC1118a y eEC1118b se observa una cierta gradación en la tolerancia al compuesto sugiriendo que, en el caso de que se trate de mutación genómica, ésta no es homocigota. Las esporas T6a (eEC1118b) y T10c (eEC1118a) dan derivados con una tolerancia mayor y menor, respectivamente, a 2DG en presencia de glicerol mientras que la espora T3b presenta una tolerancia intermedia. La espora 8b procedente de eEC1118a (a8B) y la espora T7a procedente de eEC1118b (b7A) son más resistentes a 2DG en presencia de glicerol como única fuente de carbono por lo que se analizaron en cultivo líquido en medios de laboratorio (Figura 56) y en condiciones de vinificación (Figura 57). El interés de la evolución dirigida es obtener cepas que presentasen fenotipos de interés en condiciones de vinificación por lo que se seleccionaron aquellas esporas (T8b y T7a) que eran más resistentes a 2DG y ligeramente a glucosamina.



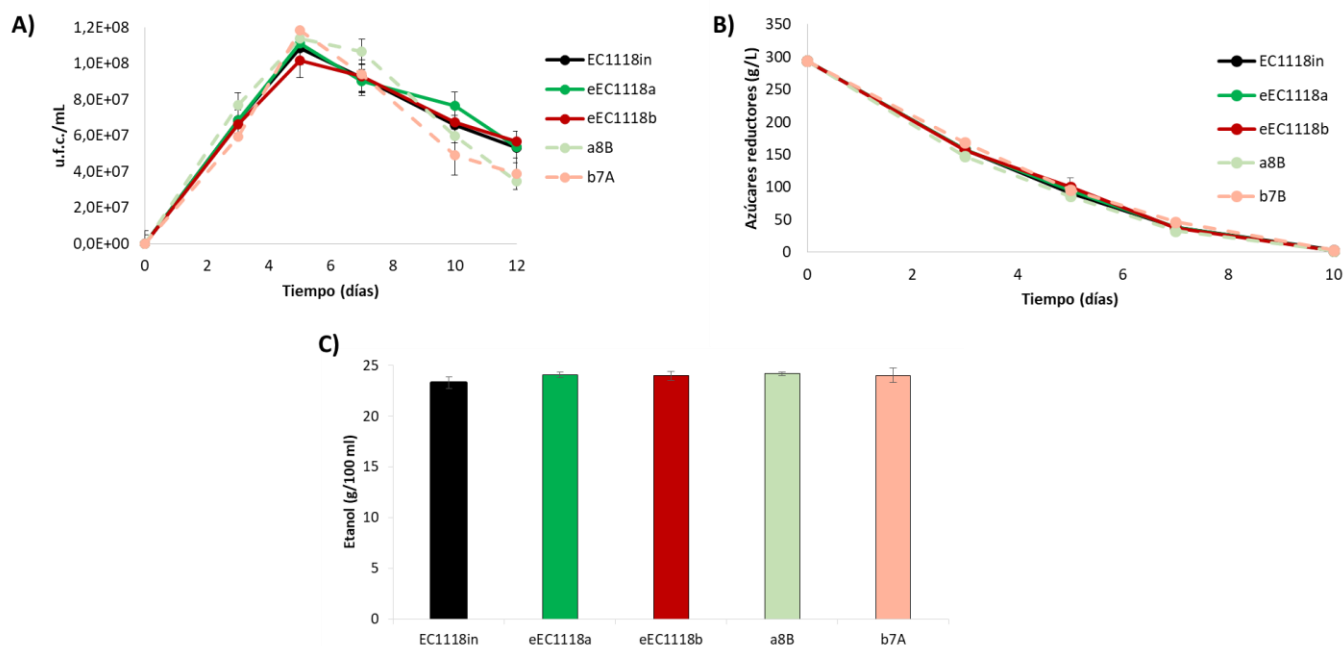
**Figura 55.** Análisis de crecimiento mediante goteos en placas en presencia de glicerol como fuente de carbono, y en presencia o no de 2DG y GlcN, de las cepas evolucionadas en presencia de 2DG transcurridas 50, 100, 150 y 200 generaciones (G) junto con las esporas procedentes de eEC1118in, eEC1118a y eEC1118b. Las esporas procedentes de la misma tétrada se indican con el mismo número y diferente letra. En rojo se muestran las esporas seleccionadas para análisis posteriores. 2DG: 2-desoxiglucosa (100  $\mu\text{g/mL}$ ); GlcN: glucosamina (0.05 %).

En la Figura 56 se muestra el crecimiento en YPD (panel A) y en YPSac (panel B), de las esporas a8B, b7A y de sus respectivos parentales transcurridas 200 generaciones (eEC1118a y eEC1118b). También se realizó el crecimiento en placa multipocillo en medio YPGli; sin embargo, el crecimiento fue muy pobre como para obtener parámetros cinéticos (datos no mostrados). Las cepas evolucionadas presentan una velocidad de crecimiento menor que la cepa EC1118in en medio YPD, observándose que la espora b7A es la que alcanza una D.O.<sub>600</sub> menor. En presencia de sacarosa como fuente de carbono (panel B) las cinéticas de crecimiento varían respecto del crecimiento en presencia de glucosa (panel A). En este caso, la cepa eEC1118b presenta una cinética muy similar a la cepa inicial EC1118in mientras que las demás cepas analizadas (eEC1118a, a8B y b7A) presentan fases de latencia y exponencial muy similares. La espora a8B presenta un crecimiento menor que su parental eEC1118a, cuya densidad final es mayor en YPSac (panel B).



**Figura 56.** Análisis fenotípico de las cepas evolucionadas eEC1118a y eEC1118b y de las esporas a8B y b7A., Curvas de crecimiento en medio completo YPD (A) y medio YPSac (B).

Se realizó una vinificación en mosto Bobal ya que las condiciones de crecimiento en vinificación difieren completamente de las de laboratorio. La vinificación se llevó a cabo con la cepa EC1118in, las cepas evolucionadas eEC1118a y eEC1118b a 200 generaciones y las cepas obtenidas del proceso de esporulación a8B y b7A. La vinificación se siguió mediante recuento en placa, consumo de azúcares reductores y cuantificación del etanol al final de la fermentación (Figura 57).



**Figura 57.** Comportamiento de las cepas evolucionadas en presencia de 2-desoxiglucosa en condiciones de vinificación en mosto natural Bobal. Crecimiento durante el proceso de fermentación medido como u.f.c./mL (A). Cinética de consumo de azúcares reductores durante el proceso de fermentación (B). Concentración de etanol al finalizar la fermentación alcohólica (C). Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se analizan las cepas eEC1118a y eEC1118b junto con las esporas 8B procedente de eEC1118 (a8B) y la espora 7A de eEC1118b (b7A).

El mosto presenta como fuente de carbono principalmente glucosa y fructosa en cantidades equimolares. Tal y como se ha observado en los paneles anteriores ni en medio YPD (glucosa) ni en YPSac (sacarosa) se observan diferencias de crecimiento en las cepas evolucionadas indicando que el consumo de estas fuentes de carbono no se ha visto comprometido durante la evolución dirigida frente a 2DG. Consistentemente, no se observan diferencias en el consumo de azúcares reductores ni en la producción de etanol, mostrados en los paneles B y C de la Figura 57.

Lane et al., (2018) también realizaron una evolución dirigida en presencia de 2DG y xilosa con el objetivo de que las cepas evolucionadas fueran capaces de consumir simultáneamente la glucosa y la xilosa. La capacidad de consumir ambos azúcares que se obtuvo en dicho experimento no residió en una mutación en los transportadores de hexosas sino en un flujo reducido de la glucosa mediante mutaciones en la hexoquinasa (HXK1/2) y glucoquinasa (GLK1). Ambas enzimas están implicadas en el proceso de fosforilación de la glucosa, paso esencial para disparar el consumo de glucosa vía glucólisis. En concordancia con estos resultados, se encuentra el estudio realizado por Ralser et al., (2008) donde la mayor tolerancia a 2DG se consiguió mediante el desvío de las fuentes de carbono vía ruta de los fosfatos de pentosa. Sin embargo, el mutante de delección en la glucosa-6P-deshidrogenasa, enzima implicada en el primer paso de la ruta de los fosfatos de pentosa, es más resistente a la 2DG. Por otra parte, McCartney et al., (2014) demostraron que la 2DG induce la activación de Snf1p en presencia de glucosa como fuente de carbono pero no induce la activación de Mig1p, uno de los sustratos más estudiados de Snf1p. Estos resultados indican que la tolerancia a 2DG no suele deberse a mutaciones en genes implicados en su captación sino en la regulación de los destinos metabólicos de la glucosa. Una posible alternativa sería realizar una evolución dirigida únicamente en presencia de una fuente de carbono diferente a la glucosa, como el glicerol o la galactosa. Sin embargo, el problema de estas fuentes de carbono es que no soportan un buen crecimiento de las cepas por lo que el número de divisiones y, por tanto, de generaciones transcurridas sería muy bajo.

La principal ventaja de las cepas obtenidas mediante evolución dirigida dentro de la Unión Europea es que no son considerados organismos modificados genéticamente por lo que podrían aplicarse a nivel industrial. Sin embargo, en ambas evoluciones dirigidas se ha podido determinar que, aunque se ha realizado el mismo experimento, ambas réplicas han evolucionado de manera diferente a pesar de presentar la misma presión selectiva. Al tratarse de evoluciones dirigidas realizadas frente a dos inhibidores químicos cabe la posibilidad de que el aumento de la tolerancia se deba a mutaciones específicas que impidan su modo de acción o bien a mecanismos de expulsión fuera de la célula. Aunque el resultado final de las réplicas obtenidas es el mismo (aumento de la tolerancia), las diferentes formas de alcanzar dicha tolerancia o resistencia son de gran interés puesto que aumentan la variabilidad de la respuesta al inhibidor introducido. Lamentablemente eso no se ha relacionado con la mejora significativa de eficiencia de estas levaduras a la hora de llevar a cabo la fermentación vínica, aunque tampoco suponen en la mayoría de los casos un menoscabo tecnológico. Algunas cepas más tolerantes a rapamicina presentan una mayor longevidad cronológica durante la vinificación o una fase de latencia reducida en agitación, mientras que algunas evolucionadas frente a 2DG alcanzan mayor densidad final en sacarosa, lo que podría ser interesante en condiciones de producción de biomasa en melaza. Estas pequeñas ventajas podrían ser utilizadas para mejorar cepas no comerciales deficientes en estos aspectos. Los resultados de ambas evoluciones dirigidas dejan patente la necesidad de ampliar el conocimiento sobre las rutas de señalización de nutrientes pero, sobre todo, en la coordinación entre todas ellas en

función de los estímulos presentes. Es interesante que en la evolución en presencia de rapamicina se altere la sensibilidad a 2DG (Figura 34 panel B), mientras que la evolución en presencia de 2DG altere, en algunos casos, la sensibilidad a rapamicina (Figura 52 panel A), lo que indica lo muy imbricadas que están las rutas. Este conocimiento permitirá realizar evoluciones dirigidas más centradas en modificar la regulación de los estímulos que en la modificación de genes específicos.

## 4. Estudio de la actividad de las rutas de señalización de nutrientes en cepas vínicas mediante análisis del estado de fosforilación de sus dianas

La fermentación alcohólica del vino es un proceso tipo *batch* y como tal los nutrientes se consumen a lo largo del tiempo y los productos tóxicos se acumulan. Además, el mosto presenta un desequilibrio en la disponibilidad de azúcares y de fuentes de nitrógeno por lo que el estudio de las rutas de señalización de nutrientes es de gran interés para conocer cómo responde *S. cerevisiae* a dicho desequilibrio. Experimentos de tolerancia frente inhibidores químicos previamente expuestos muestran que uno de los rasgos fenotípicos diferenciales más claros entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio es la tolerancia a rapamicina (Figura 14 panel A y Figura 30 panel A) y 2-desoxiglucosa (Figura 16, panel A). Mientras que las cepas vínicas son más resistentes tanto a rapamicina como a 2-desoxiglucosa, el crecimiento de las cepas de laboratorio en presencia de dichos inhibidores es muy reducido. Estos resultados sugieren que las cepas vínicas responden de manera diferente a los nutrientes presentes en el medio. Como consecuencia, conocer el estado de activación de las rutas de señalización de nutrientes puede proporcionar información sobre las diferencias observadas entre cepas vínicas y cepas de laboratorio, pero principalmente indicará qué ruta es relevante en cada etapa de la vinificación.

La fosforilación es un proceso postraducciona de gran importancia biológica puesto que prácticamente todos los procesos celulares y rutas de señalización están controladas parcialmente mediante procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. El estado de fosforilación y, como consecuencia, de actividad de las proteínas diana que forman parte de la ruta, vendrá determinado por la acción de las quinasas y de las fosfatasas. Por lo tanto, estudiando el estado de fosforilación de las proteínas dianas se puede discernir el estado de activación de la ruta de señalización de nutrientes. El estudio de la actividad de las rutas de señalización de nutrientes mediante el análisis del estado de fosforilación de las proteínas diana que forman parte de dichas rutas permitirá ampliar el conocimiento sobre cómo *S. cerevisiae* es capaz de coordinar las diferentes rutas para responder específicamente a las condiciones ambientales, ya sean condiciones de laboratorio o condiciones de fermentación alcohólica. Además, la posibilidad de realizar dicho estudio en ambas condiciones permite observar diferentes respuestas entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio en función del medio de crecimiento.

### 4.1. Análisis de las rutas de señalización en condiciones de laboratorio

Las condiciones de laboratorio difieren completamente de las producidas durante la fermentación alcohólica del mosto. En el apartado 4 de la Introducción se indicaron las diferencias observadas entre los principales nutrientes presentes tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de fermentación industrial. Inicialmente, las condiciones de laboratorio están diseñadas para obtener una buena propagación y crecimiento de la levadura

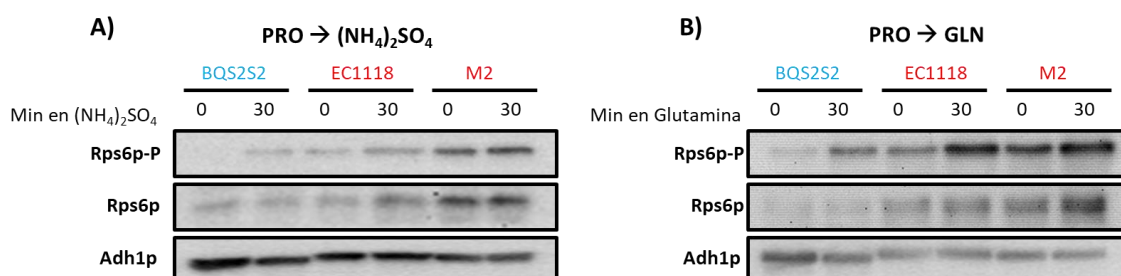
por lo que presenta todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Sin embargo, las deficiencias de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos durante la fermentación del mosto propician que el crecimiento de *S. cerevisiae* difiera por completo del descrito en condiciones de laboratorio. No obstante, todas las rutas han sido caracterizadas en relación con medios de cultivo definidos por lo que el primer paso es recurrir a dichos medios, con las modificaciones requeridas, para detectar la activación o inactivación de cada ruta de señalización de nutrientes.

#### 4.1.1. Estudio de la actividad del complejo TORC1

##### 4.1.1.1. Análisis de la fosforilación de Rps6p

Dada la diferencia en la tolerancia a la rapamicina, inhibidor de TORC1, entre las cepas vínicas y la de laboratorio, se decidió estudiar la actividad de la ruta TORC1 en condiciones de laboratorio a través de la fosforilación de la proteína ribosomal Rps6p en las cepas vínicas EC1118 y M2, las dos cepas comerciales con comportamiento más dispar respecto a la resistencia a rapamicina, y la cepa de laboratorio BQS252.

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 6.2.1), Rps6p es una proteína ribosomal perteneciente a la subunidad 40S que forma parte de las dianas de TORC1 incluidas en la rama denominada “síntesis de ribosomas y proteínas” (Figura 5). La fosforilación de Rps6p responde a múltiples estímulos, de hecho, Yerlikaya et al., (2016) demostraron que Rps6p es fosforilado por la quinasa Ypk3p por acción de TORC1 y TORC2 y defosforilado por la fosfatasa Shp1p-Glc7p, implicada también en la defosforilación de Snf1p. Precisamente por ello, se estudió si la fosforilación de Rps6p respondía al cambio de fuente de nitrógeno de igual forma en las cepas vínicas. Para ello, las células se incubaron en presencia de prolina (fuente de nitrógeno pobre) y, en fase exponencial, las células se cambiaron a un medio que contenía amonio (Figura 58 panel A) o glutamina (Figura 58 panel B).



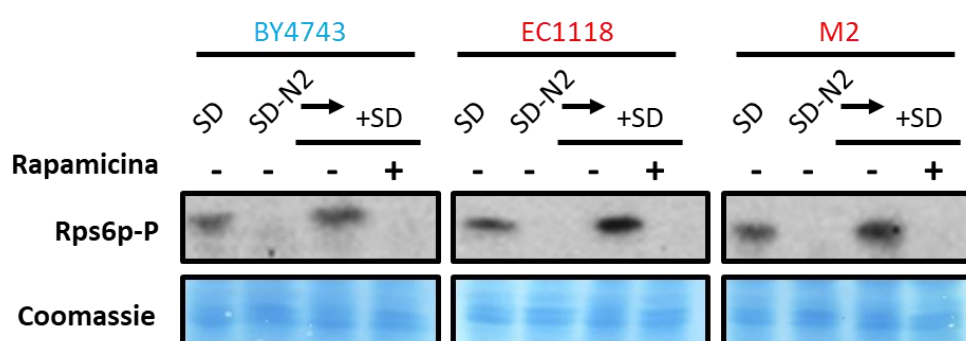
**Figura 58.** Análisis de la fosforilación de Rps6p de las cepas cultivadas en medio mínimo SD con prolina (0.5 g/L) como fuente de nitrógeno y transferidas posteriormente a un medio con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.5 g/L) (A) o glutamina (0.5 g/L) (B) como única fuente de nitrógeno. La detección se realizó con un anticuerpo que reconoce las S232/S233 fosforiladas de Rps6p. Se utilizó la proteína Adh1p como control de carga. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados. Se ha añadido el uracilo para suplir la auxotrofia de la cepa BQS252. Rps6p-P: fosforilación de Rps6p en las S232/233; Rps6p: Rps6p total. Azul: cepa de laboratorio. Rojo; cepas vínicas.

La adición de amonio induce una clara fosforilación de Rps6p para la cepa de laboratorio BQS252 pero la diferencia es mínima para las cepas vínicas EC1118 y M2, donde la fosforilación ya está presente en condiciones basales. Es posible que la diferencia radique en que las cepas vínicas sean capaces de utilizar mejor la prolina como fuente de nitrógeno. Como consecuencia de dicho consumo, son capaces de crecer y, por tanto, la ruta TORC1 se mantiene activa. Por otra parte, la inducción de la fosforilación de Rps6p producida por la glutamina es mayor que

la inducida por el sulfato de amonio ya que la glutamina es considerada una buena fuente de nitrógeno por soportar mejor el crecimiento que el amonio. La inducción se observa en todas las cepas aunque la fosforilación basal es mayor en las cepas vínicas. Esos resultados indican también unos niveles más elevados de Rps6p total presente en las cepas vínicas, lo que puede contribuir a que la forma fosforilada sea también más abundante.

La fosforilación de Rps6p en prolina (tiempo t0) indica que las cepas vínicas presentan la ruta TORC1 más activa (fosforilación basal) que las cepas de laboratorio. Ello podría explicar la mayor tolerancia frente a rapamicina. Al presentar TORC1 más activo, la rapamicina no sería capaz de inducir su completa inactivación. Sin embargo, estas conclusiones no concuerdan pues la cepa M2, la cual presenta el nivel de fosforilación de Rps6p mayor en crecimiento en prolina es más sensible a la rapamicina que EC1118.

A continuación, se comprobó si la fosforilación de Rps6p también respondía al ayuno de nitrógeno y a la rapamicina, utilizando en este experimento las cepas vínicas EC1118 y M2 junto con la cepa de laboratorio BY4743. La selección de la cepa BY4743 como cepa de laboratorio control reside en que se trata de una cepa diploide, al igual que las cepas vínicas analizadas, y sus cepas parentales (BY4742 o BY4741) se han utilizado para el análisis de la fosforilación de Rps6p (González et al., 2015; Yerlikaya et al., 2016). En este experimento, las células se cultivaron en medio mínimo SD y cuando alcanzaron la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a medio SD sin nitrógeno (SD-N2) durante una hora. Posteriormente, se volvieron a transferir a medio mínimo SD fresco o bien se realizó un tratamiento con rapamicina también en dicho medio. Como puede verse en la Figura 59, inicialmente todas las cepas presentan Rps6p fosforilado en medio mínimo, ya que están en presencia de amonio. Al eliminar el nitrógeno del medio se observa la defosforilación de Rps6p en todas las cepas. Al añadir medio rico en amonio, la fosforilación es alta, pero sin embargo, el tratamiento con rapamicina sí que es capaz de inactivar la ruta TORC1. Aunque el ayuno de nitrógeno y el tratamiento con rapamicina inhiben la ruta TORC1, las dianas implicadas en la respuesta frente a dichas condiciones difiere (Cox et al., 2004; Urban et al., 2007). La rapamicina y el ayuno de nitrógeno son condiciones equivalentes respecto a la fosforilación de Rps6p.



**Figura 59.** Análisis de la fosforilación de Rps6p de las cepas cultivadas en medio mínimo SD, transferidas durante 1 h a medio SD-N2 y retornadas a medio SD en ausencia o en presencia de rapamicina (200 ng/ mL) durante 20 min. La detección se ha realizado utilizando el anticuerpo que reconoce las S232/S233 fosforiladas de Rps6p. Rps6p-P: Rps6p fosforilado. Azul: cepa de laboratorio. Rojo; cepas vínicas.

A continuación se amplió el estudio de la fosforilación de Rps6p en presencia de otros inhibidores químicos directos de TORC1, como por ejemplo la cafeína; o bien que lo inhiban indirectamente por el ayuno de ciertos aminoácidos como la L-metionina sulfoximina. También se ensayó en presencia de otros inhibidores con mecanismos similares al MSX como el GA, el aminotriazol o el SM. Los resultados de estos análisis de fosforilación de Rps6p se muestran en la Figura 60.

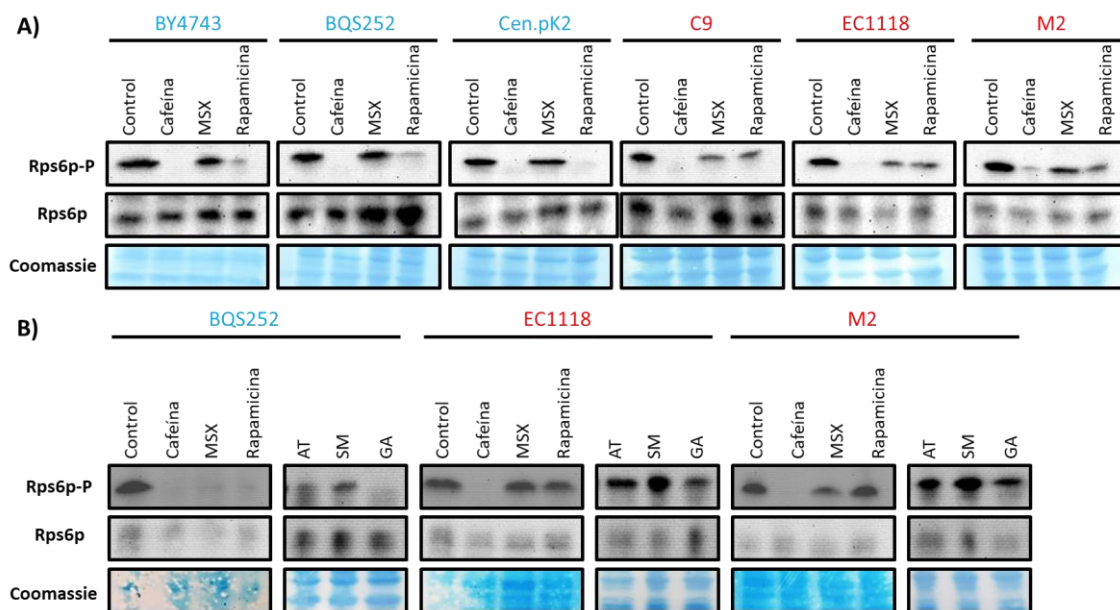
Tanto en el panel A como en el panel B de la Figura 60 se observa que la cafeína inhibe por completo la fosforilación de Rps6p en todas las cepas ensayadas, tres vínicas (rojo) y tres de laboratorio (azul). Sin embargo, la respuesta en presencia de rapamicina es diferente. Mientras que las cepas vínicas (C9, EC1118 y M2) presentan una banda clara de la proteína Rps6p fosforilada, la intensidad de dicha banda en presencia de rapamicina en las cepas de laboratorio es menor e incluso nula en la cepa CEN.PK. El MSX inhibe la glutamina sintetasa y, como consecuencia, causa un ayuno de glutamina, principal donador de grupos amino. En el panel A se muestra que el MSX no causa la defosforilación de Rps6p y, por tanto, se puede deducir que la ruta TORC1 está todavía activa respecto a esa rama, lo cual puede explicarse por la necesidad de adición al medio de los aminoácidos requeridos para suplir las auxotrofías de las cepas de laboratorio. En cepas vínicas la defosforilación es también incompleta, por lo que el efecto de la inhibición de TORC1 es parcial.

Las diferencias de fosforilación de Rps6p también se hacen patente en presencia de otros inhibidores químicos, como aminotriazol, sulfometuronmetil y glufosinato de amonio, ensayados esta vez en un conjunto más limitado de cepas (Figura 60 panel B). Estos tres compuestos inhiben distintos puntos de la síntesis de diversos aminoácidos. El AT inhibe la síntesis de histidina, el SM la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y el GA la glutamina sintetasa causando un ayuno de glutamina, de manera similar al MSX. Los resultados sugieren que el AT y el SM no afectan a la fosforilación de Rps6p y el GA únicamente en la cepa de laboratorio. Las diferencias observadas en la fosforilación de Rps6p frente a compuestos que inhiben la síntesis de determinados aminoácidos o el complejo TORC1 de forma directa sugieren que una mayor fosforilación podría estar relacionada con un mayor crecimiento. Sin embargo, Yerlikaya et al., (2016) concluyeron que cual sea la función de la fosforilación de Rps6p, no está relacionado con la traducción de mRNAs. Por otra parte, el hecho de observar el mismo fenotipo de respuesta frente a la mayoría de los inhibidores analizados entre diferentes cepas de laboratorio y cepas vínicas sugiere que la respuesta no es dependiente de cepa y es un mecanismo general que opera de manera similar en todas las cepas de levadura analizadas.

Respecto al MSX, cuando únicamente se añade uracilo en el medio de cultivo ya que la cepa BQS252 solo presenta esa auxotrofía (Figura 60 panel B), su fenotipo cambia respecto al observado en la Figura 60 (panel A), donde están presentes los requerimientos para suplir las auxotrofías de BY4743. En presencia únicamente de uracilo, no se observa fosforilación de Rps6p en presencia de MSX, indicando la inhibición total de TORC1. Esta diferencia en la respuesta frente a MSX se debe a la presencia de aminoácidos adicionados al medio de cultivo de los experimentos descritos en el panel A de la Figura 60 para posibilitar el crecimiento del resto de las cepas de laboratorio, que presentan además auxotrofías para aminoácidos. Al añadir el MSX pero haber metionina, leucina e histidina disponibles, o bien la cepa BQS252 es capaz de hacer frente a la inhibición de la glutamina sintetasa utilizando los grupos amino procedentes de los aminoácidos presentes en el medio o bien los aminoácidos presentes alteran la señalización al complejo TORC1 modificando su actividad; sin embargo, en presencia



de amonio como única fuente de nitrógeno, la ruta TORC1 se encuentra inhibida, Figura 58. El fenotipo de las cepas vínicas en ambos experimentos es el mismo; el MSX no inhibe el complejo TORC1 ya que se sigue observando fosforilación de Rps6p. La fosforilación de Rps6p de las cepas vínicas y las cepas de laboratorio difiere en respuesta a la rapamicina.



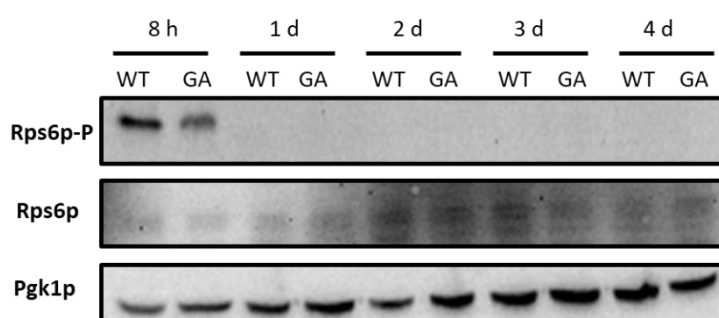
**Figura 60.** Análisis de la fosforilación de Rps6p. Las células en fase exponencial cultivadas en medio mínimo SD se recogieron como control; el resto fueron tratadas durante 30 minutos con cafeína (20 mM), L-metionina sulfoximina (MSX, 2 mM), rapamicina (200 ng/mL), aminotriazol (AT, 10 mM), sulfometuronmetil (SM, 1 mg/mL) o glufosinato de amonio (GA, 10 mg/mL) durante 30 minutos (A) El medio fue suplementado con uracilo (20 mg/L), metionina (20 mg/L), leucina (100 mg/L) e histidina (20 mg/L) para suplir las auxotrofías de las cepas de laboratorio (B) El medio fue suplementado con uracilo (20 mg/L) para suplir la auxotrofia de la cepa BQS252. Rps6p-P: rps6p fosforilado. Rps6p: Rps6p total. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

En todo caso, la fosforilación de Rps6p es un buen indicador del estado de activación de TORC1 ya que responde, en el caso de las cepas de laboratorio, tanto al ayuno de nitrógeno como a la rapamicina y cafeína. El hecho de que las cepas vínicas presenten un fenotipo diferente frente a rapamicina, MSX, AT, SM y GA sugiere que la mayor tolerancia a dichos compuestos sea como consecuencia de una inactivación parcial de la ruta TORC1 ya que Rps6p sigue fosforilado, aunque se observa un menor crecimiento.

Se ha mostrado que las cepas vínicas, más tolerantes a la rapamicina, presentan Rps6p fosforilado frente a rapamicina mientras que la cepa de laboratorio presenta la ruta TORC1 completamente inhibida (Rps6p no fosforilado). El estudio de las rutas de señalización de nutrientes suele realizarse con las proteínas clave de las rutas pero los resultados de la fosforilación de Rps6p sugieren que son esas pequeñas diferencias en la actividad de ciertas ramas de las rutas de señalización las que pueden causar fenotipos de interés. Sin embargo, todavía es necesario indagar más para conocer las diferencias genéticas subyacentes a esa mayor tolerancia a los inhibidores analizados y si esas diferencias son de interés en la industria vínica.

#### 4.1.1.2. Inhibición parcial de TORC1 por glufosinato amónico durante la fermentación

En el apartado 2 de este capítulo se realizó un estudio del efecto del glufosinato de amonio en vinificación ya que se observó que el crecimiento de la cepa vínica EC1118 era menor en presencia de dicho compuesto (Figura 21). Además, al ser parte del herbicida comercial Finale® pueden encontrarse trazas durante la fermentación causando una ralentización de la misma. Tal y como se observa en la Figura 22 el fenotipo observado frente al GA en la cepa EC1118 se mantiene en C9 y, debido a la facilidad de manejo y transformación de la cepa C9, los determinantes genéticos de la sensibilidad a GA se analizaron mediante mutantes de delección en la cepa C9. Por ello, con el objetivo de ahondar más en el efecto del GA sobre la inhibición de la ruta TOR, se siguió la fosforilación de la proteína ribosomal Rps6p a lo largo de la vinificación en mosto sintético MS300 en la cepa haploide vínica C9, Figura 61. El glufosinato de amonio inhibe parcialmente la ruta TOR en condiciones de vinificación en mosto natural.



**Figura 61.** Efecto del glufosinato de amonio en la fosforilación de la proteína Rps6p a lo largo de la vinificación en mosto natural. Las células cultivadas se recogieron en los tiempos indicados durante la vinificación. El GA se añadió al inicio de la vinificación a una concentración de 10 mg/L. Se han llevado a cabo detecciones con anticuerpos frente a Rps6 fosforilado, a Rps6 total y Pgk1p como control de carga. Se muestra uno de los dos experimentos realizados en los que se obtuvieron resultados similares.

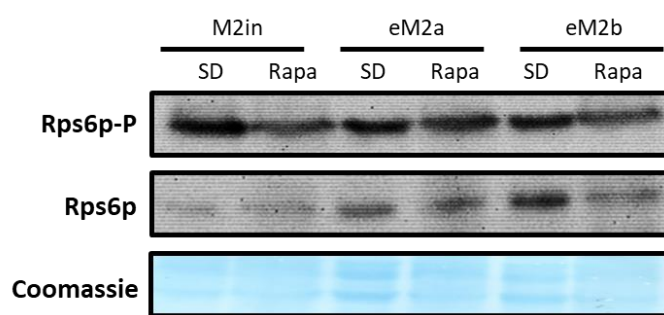
En la Figura 61 se observa la fosforilación de Rps6p únicamente en las primeras horas de fermentación, no observándose proteína fosforilada a tiempos mayores, a pesar de que se detecta la proteína Rps6p a lo largo de la vinificación. La fosforilación de Rps6p indica actividad de la ruta TORC1 por lo que al observar únicamente banda correspondiente a Rps6p-P en las primeras horas se deduce que la ruta TORC1 únicamente está activa en las primeras horas de fermentación. En presencia de GA se observa el mismo resultado, sin embargo, el nivel de fosforilación es menor. Esa diferencia en los niveles de fosforilación sugiere una inhibición parcial de la ruta TORC1, causando por tanto un menor crecimiento celular. El máximo de crecimiento para la cepa C9 en las mismas condiciones se alcanza a los 2 días de fermentación, lo que sugiere la implicación de otras rutas de señalización de nutrientes que sustentan el crecimiento, como se verá más adelante.

#### 4.1.1.3. Efecto de la evolución dirigida frente a rapamicina en la fosforilación de Rps6p

En el apartado 3.1 de este capítulo se analizaron las cepas procedentes de una evolución dirigida en presencia de rapamicina con la cepa M294. El único fenotipo en cuanto a crecimiento de las cepas evolucionadas fue la mayor tolerancia a rapamicina, observada en goteos en placa (Figura 36). Con el objetivo de ahondar más en los posibles cambios provocados como consecuencia del crecimiento reiterado en presencia de rapamicina, se

analizó la fosforilación de la proteína Rps6p tanto en las cepas evolucionadas eM2a y eM2b como en la cepa M2in para averiguar si esa mayor tolerancia a rapamicina concordaba con una menor inactivación de la ruta TORC1, tal y como se ha observado entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio.

Las cepas se cultivaron en medio mínimo SD para acuciar más las diferencias. En fase exponencial, parte de las células se recogieron como control y el resto se incubaron 30 min con rapamicina. Los resultados se muestran en la Figura 62. Tal y como se había observado anteriormente (Figura 60), la proteína ribosomal Rps6p se encuentra fosforilada en fase exponencial. Se observa una bajada en la intensidad de la banda correspondiente a Rps6p fosforilado como consecuencia del tratamiento en presencia de rapamicina. Esa disminución de la fosforilación sugiere una inactivación parcial de la ruta TORC1 y es similar entre las cepas analizadas, evolucionadas o no. La cantidad de proteína total Rps6p sí parece ser mayor en las cepas evolucionadas que en la cepa M2in. La mayor tolerancia frente a rapamicina de las cepas evolucionadas no podría explicarse completamente por una mayor activación de rama de la ruta TORC1 que se mide a través de la fosforilación de Rps6p.



**Figura 62.** Fosforilación de Rps6p en las cepas evolucionadas en presencia de rapamicina. Se muestra la fosforilación de Rps6p y los niveles de proteína en células procedentes de cultivo en fase exponencial en medio mínimo SD. El tratamiento con rapamicina (200 ng/mL) se ha realizado durante 30 min.

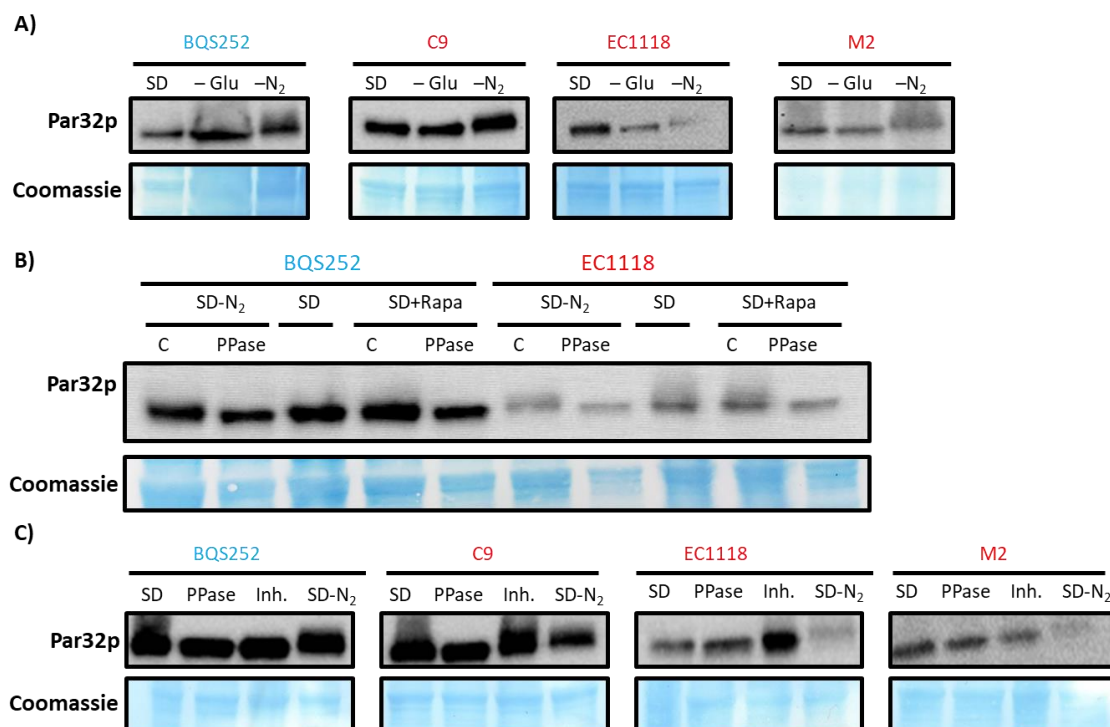
#### 4.1.1.4. Análisis de la fosforilación de Par32p

Dado que la fosforilación de Rps6p en presencia de rapamicina indica una inactivación parcial de su correspondiente rama de la ruta TORC1 en las cepas de vínicas, y no una inactivación completa como ocurre en las cepas de laboratorio, se seleccionó otra diana perteneciente a una rama de regulación distinta, la proteína Par32p (*Phosphorylated After Rapamycin*). Tal y como se comentó en el apartado 6.2.1 de la Introducción, Par32p es una proteína que se hiperfosforila en presencia de rapamicina y cuya fosforilación y localización es dependiente de TORC1 a través de Npr1p, proteína relacionada con las permeasas de aminoácidos. De hecho, un mutante de delección en *PAR32* es más sensible tanto a cafeína como a rapamicina (Arias et al., 2011; Dudley et al., 2005).

En primer lugar se analizó el estado de fosforilación de la proteína Par32p en ausencia de glucosa y nitrógeno (Figura 63, panel A). Para ello, las cepas vínicas C9, EC1118 y M2 junto con la cepa de laboratorio BQS252 se crecieron en medio mínimo SD. En fase exponencial, se transfirieron a un medio mínimo sin glucosa (-Glu) o sin nitrógeno (-N2). Los resultados del análisis por *western blot* con un anticuerpo frente a la etiqueta Myc introducida en la proteína Par32p pueden observarse en el panel A de la Figura 63. Se observa claramente que la única condición que disminuye la movilidad electroforética de Par32p, lo que se interpreta como un

efecto del aumento de su fosforilación, es la ausencia de nitrógeno. Todas las cepas, tanto vínicas como de laboratorio, responden por igual a las condiciones examinadas, si bien es cierto que los niveles de Par32p en las cepas EC1118 y M2 parecen disminuir tanto en ausencia de glucosa como en ausencia de nitrógeno, observándose más claramente en esta última condición.

Inicialmente, la fosforilación de Par32p parece responder a la ausencia de nitrógeno, estando dicha condición relacionada con la inactivación de la ruta TORC1. Sin embargo, para corroborar que el tratamiento con rapamicina induce su fosforilación, tal y como indica su nombre, se realizó un nuevo experimento de detección por *western blot* de Par32p procedente de células sometidas a tratamiento con rapamicina. En este experimento, las células se recogieron en fase exponencial después del crecimiento en medio mínimo SD y se optó por dos condiciones: SD sin nitrógeno (SD-N2) y SD con rapamicina. Para corroborar que la disminución de movilidad electroforética observada es realmente debida a un aumento en el estado de fosforilación, se incluyó también una muestra de cada condición tratada con fosfatasa lambda, que defosforila las proteínas y, por tanto, es de esperar que revierta el efecto sobre la movilidad electroforética atribuido al aumento de fosforilación. Los resultados se muestran en el panel B de la Figura 63. En ayuno de nitrógeno se observa que la banda correspondiente al tratamiento con la fosfatasa está más definida que la de su correspondiente control, lo que se interpreta como la desaparición de formas fosforiladas de menor movilidad electroforética que generan el aspecto de banda ancha y difusa detectada en las muestras SD-N2. El mismo fenotipo se observa para el tratamiento con rapamicina. Ambos resultados indican que la movilidad electroforética disminuida de Par32p observada es consecuencia de un proceso de fosforilación. La disminución de la movilidad electroforética debido al tratamiento con rapamicina es ligeramente inferior al producido como consecuencia del ayuno de nitrógeno. Sin embargo, puede observarse perfectamente por lo que, en ambas condiciones, la fosforilación de Par32p es una herramienta útil para estudiar la actividad de TORC1. Para estudiar la fosforilación en fase exponencial de crecimiento de las cepas en medio mínimo SD, también se realizó el tratamiento con fosfatasa con el control en SD (Figura 63 panel C). En este caso, se hicieron tres alícuotas de las células procedentes del medio de cultivo. Las proteínas se extrajeron sin inhibidores de proteasas (SD), con fosfatasa lambda o con inhibidores de proteasas. También se volvió a realizar el tratamiento en ausencia de nitrógeno para poder comparar la movilidad electroforética con las demás condiciones. En este caso, la banda del tratamiento con la fosfatasa lambda y los inhibidores se encuentra a la misma altura en las cepas BQS252, EC1118 y M2 indicando que en medio SD la proteína Par32p se encuentra defosforilada, a excepción de la cepa C9 donde se observa una ligera disminución de la movilidad electroforética (Par32p ligeramente fosforilada). La banda correspondiente a SD también se encuentra a la misma altura que las de los tratamientos (inhibidores y fosfatasa lambda). El ayuno de nitrógeno vuelve a causar una fosforilación de Par32p. Por lo tanto, la fosforilación de Par32p responde a la fuente de nitrógeno y a rapamicina pero no al ayuno de glucosa.

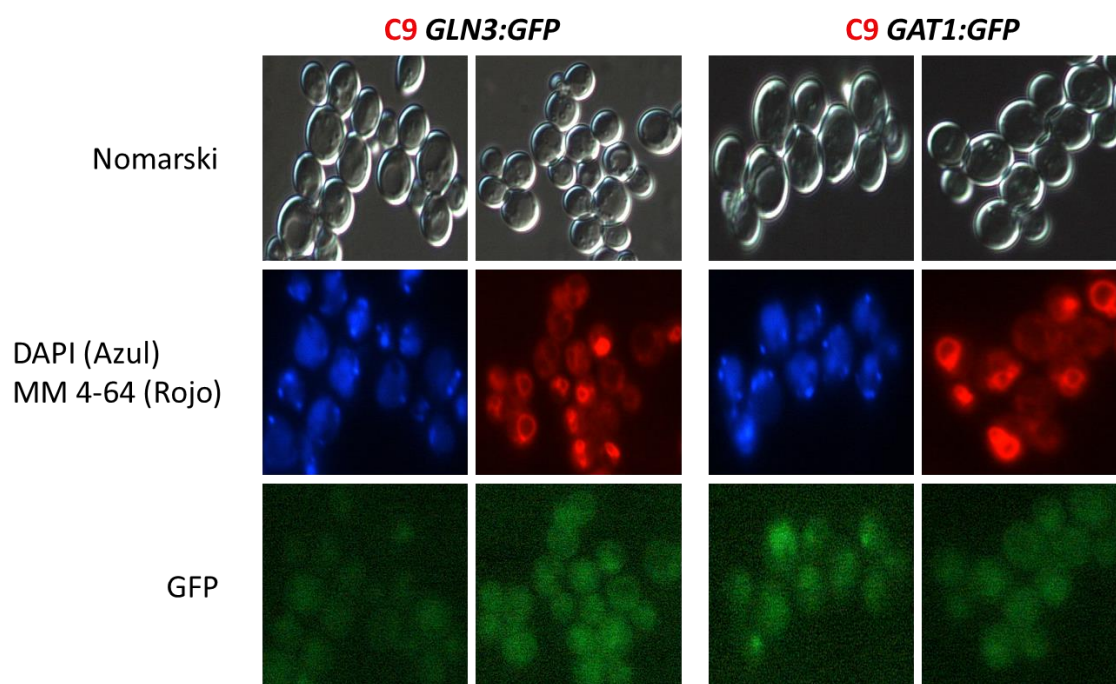


**Figura 63.** Inmunodetección de la proteína etiquetada *PAR32::Myc* utilizando un anticuerpo específico contra la etiqueta Myc. En fase exponencial las células cultivadas en un medio mínimo SD se han transferido a un medio SD sin nitrógeno ( $-N_2$ ) o sin glucosa ( $-Glu$ ) durante 20 minutos (A). Tratamiento con  $\lambda$  fosfatasa durante 30 minutos a 30 °C para la defosforilación total de Par32p en muestras de las condiciones de ayuno de nitrógeno o tratamiento con rapamicina (200 ng/mL) durante 20 min (B). Parte de las células cultivadas en medio mínimo SD en fase exponencial se han tratado con  $\lambda$  fosfatasa durante 30 min a 30 °C para la defosforilación total de Par32p o bien con inhibidores de fosfatasas con el objetivo de inhibir la defosforilación (C). El ayuno de nitrógeno se ha realizado durante 20 en medio SD. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas. Los medios utilizados han sido suplementados con los requerimientos nutricionales necesarios para suplir las auxotrofías de la cepa BQS252.

Aunque Par32p se fosforila después del tratamiento con rapamicina su función todavía es desconocida. En presencia de una fuente de nitrógeno no preferida, la quinasa de Npr1p relacionada con las permeasas de aminoácidos se encuentra activa induciendo la fosforilación de la proteína Par32p. Sin embargo, cuando la fuente de nitrógeno es adecuada, TORC1 inhibe a Npr1p por lo que no es capaz de fosforilar a Par32p (Figura 5), encontrándose así defosforilada. Como consecuencia, Par32p se transloca a la membrana celular donde inhibe físicamente los transportadores de amonio Mep1/3p (Boeckstaens et al., 2015). El tamaño molecular de Par32p según la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) es de 32 kDa; sin embargo, todos los *western blot* mostrados en las figuras anteriores coinciden con un tamaño de alrededor de 70 kDa, de acuerdo con el marcador de tamaño molecular empleado. Dicho tamaño no disminuye en gran medida con el tratamiento con fosfatasa. Esa gran diferencia de tamaño, también observada por otros autores (Boeckstaens et al., 2015; Hughes Hallett et al., 2014), sugiere que la proteína Par32p está sometida a diversas modificaciones postraduccionales que podrían estar relacionadas con su función.

#### 4.1.2. Estudio de la represión catabólica por nitrógeno (NCR)

La represión catabólica por nitrógeno (NCR) reprime el uso de fuentes de nitrógeno pobres, como la prolina o urea, en presencia de fuentes ricas, como por ejemplo la glutamina o el amonio. La respuesta a través de la NCR se lleva a cabo principalmente por los factores transcripcionales tipo GATA, siendo Gln3p y Gat1p los dos activadores más estudiados. Tal y como se ha comentado en el apartado 6.2.2 de la Introducción, en presencia de una fuente de nitrógeno pobre o en ayuno de nitrógeno Gln3p se transloca al núcleo para inducir la expresión de numerosos genes implicados en el uso de fuentes de nitrógeno pobres y en el catabolismo del nitrógeno. Esa translocación al núcleo de la proteína Gln3p parece estar relacionada con su estado de fosforilación de forma dependiente de TORC1, por lo que también puede utilizarse como herramienta para el estudio de la actividad de TORC1. Además, al responder de manera específica a la fuente de nitrógeno también permite determinar la adecuación de la fuente de nitrógeno utilizada. Para conocer si había alguna diferencia en la localización subcelular de la proteína Gln3p entre cepas vínicas y cepas de laboratorio en condiciones de crecimiento de laboratorio, se etiquetó *GLN3* con la etiqueta GFP en la única copia cromosómica de la cepa vínica haploide C9 (Figura 64). El etiquetado de Gln3p con GFP dio lugar a muy baja fluorescencia y a una localización subcelular muy difusa dificultando así su observación. Aunque se ha determinado que la localización de Gln3p es nuclear en las condiciones analizadas, en la Figura 64 se observa cierto aumento de la fluorescencia en estructuras de tamaño elevado que no coinciden con el núcleo. La construcción *GLN3::GFP* puede no ser funcional debido a la adición de la proteína GFP; sin embargo, ensayos de tolerancia frente a MSX y rapamicina mostraron que el fenotipo de los mutantes con la construcción *GLN3::GFP* difería del mutante *gln3Δ* y coincidía con la cepa silvestre sugiriendo que la construcción era funcional (datos no mostrados). Para determinar si la localización de la fluorescencia observada en la Figura 64 coincidía con la vacuola se realizó al mismo tiempo la tinción con MM4-64, específico de membranas vacuolares. Aunque la resolución de las imágenes tomadas para GFP no es óptima, puede observarse que en ciertas células si hay coincidencia entre la vacuola y la GFP indicando que al menos parte de esta fusión de Gln3p se encuentra en la vacuola en estas condiciones. Al ser imprescindible el seguimiento de la NCR para nuestro objetivo, se planteó la posibilidad de realizar los mismos experimentos pero siguiendo la localización subcelular del activador transcripcional Gat1p. Aunque la información disponible de dicho factor no es tan amplia como para Gln3p, su localización también varía en función de la fuente de nitrógeno. Por ello, también se etiquetó *GAT1* con la proteína GFP en la cepa vínica haploide C9, Figura 64, obteniéndose resultados muy similares a los conseguidos para Gln3p. Aunque la fluorescencia obtenida era muy baja, también se observaban ciertos acúmulos que coincidían con el núcleo, con la vacuola o bien se encontraba difusa en el citoplasma. Aunque la visualización de la proteína Gat1p a través de GFP era mejor que para Gln3p, fue imposible observar la translocación de ambos factores transcripcionales. La adición de GFP, de tamaño considerable, puede provocar la no funcionalidad de la proteína etiquetada y, por tanto, no observar el fenotipo esperado. Sin embargo, goteos en placa de las cepas etiquetadas en presencia de rapamicina no mostraron fenotipo diferencial entre las cepas etiquetadas y las cepas sin etiquetar (datos no mostrados) indicando que las construcciones eran funcionales.



**Figura 64.** Localización subcelular de las proteínas Gln3p y Gat1p en condiciones de laboratorio en la cepa haploide C9. Las células se cultivaron en medio mínimo SD y en fase exponencial se pasaron durante 1 h en medio SD con prolina (1 %) como única fuente de nitrógeno para inducir la translocación de Gat1p y Gln3p al núcleo. La tinción con DAPI (azul) se ha realizado durante 20 minutos mientras que la de MM4-64 (40  $\mu$ M) durante 15 min, en ambos casos en oscuridad y posterior lavado para eliminar el exceso del fluoróforo. La visualización de las células se ha realizado *in vivo*.

Como alternativa al etiquetado en el genoma, Giannattasio et al., (2005) construyeron versiones etiquetadas de *GLN3* y *GAT1* con GFP con sus propios promotores en el plásmido pRS416. La transformación con dichos plásmidos se realizó tanto en la cepa BQS252, que es auxótrofa para uracilo, y en la cepa C9 *ura3* $\Delta$ . La visualización tanto de Gln3p como de Gat1p fue imposible para ambas cepas. Si bien es cierto que la fluorescencia aumentó respecto a la observada para la construcción en el genoma, no fue suficiente como para realizar su seguimiento ni en condiciones de laboratorio ni en condiciones de vinificación (datos no mostrados).

#### 4.1.2.1. Análisis de la fosforilación de Gln3p

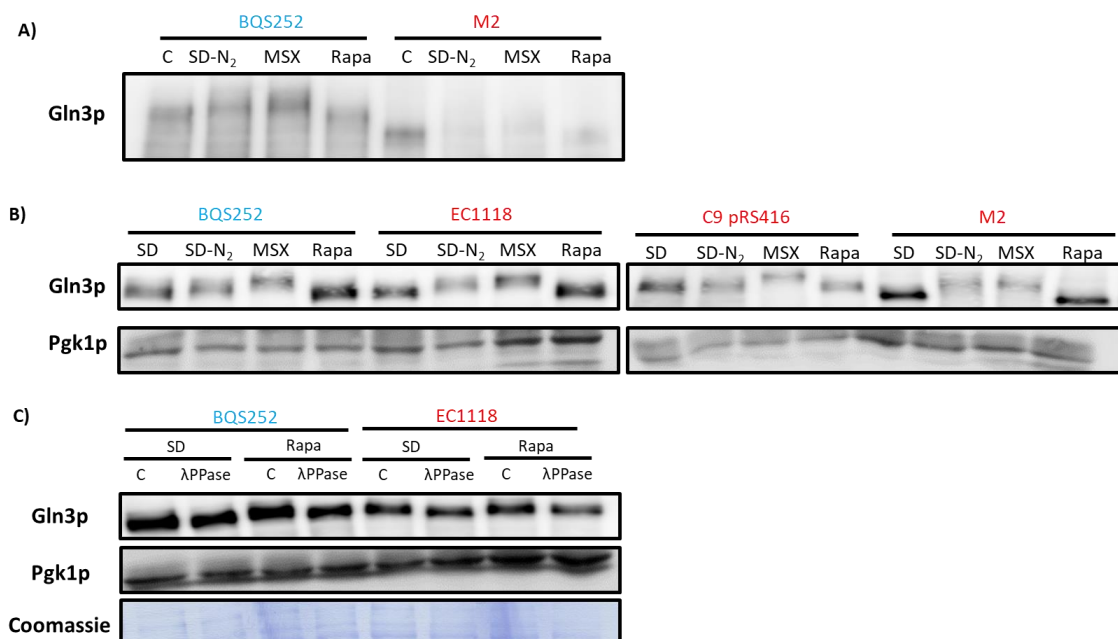
Dada la imposibilidad de observar la translocación al núcleo de los factores de transcripción Gat1p y Gln3p se optó por seguir la fosforilación de Gln3p en cepas vínicas y de laboratorio en condiciones de laboratorio, mediante *western blot* a través de su movilidad electroforética. Beck y Hall (Beck y Hall, 1999) demostraron que la rapamicina inducía la defosforilación de Gln3p y, como consecuencia, se producía su translocación al núcleo donde actuaba como activador transcripcional induciendo la expresión de genes necesarios para el uso de fuentes de nitrógeno no preferidas (apartado 6.2.2 de la Introducción). Cox et al., (2004) demostraron que la rapamicina y el crecimiento en fuentes de nitrógeno no preferidas inducen la translocación de Gln3p al núcleo pero por diferentes mecanismos, los cuales pueden implicar otras moléculas diferentes a Gln3p o bien niveles de fosforilación de Gln3p diferentes. Por ello, se planteó inicialmente estudiar el estado de fosforilación de Gln3p en nuestras condiciones de laboratorio y con nuestras cepas, tanto vínicas como de laboratorio.



En primer lugar, las células se cultivaron en medio mínimo SD con fuente de nitrógeno reducida (del 5 % al 1 %) y en fase exponencial las células se trataron con L-metionina sulfoximina, con rapamicina o bien se sometieron a ayuno de nitrógeno. Los resultados se muestran en el panel A de la Figura 65. Los resultados obtenidos fueron los esperados para las cepas de laboratorio estudiadas por diversos autores (Cox et al., 2004, 2002; Tate y Cooper, 2013; Tate et al., 2005). Tal y como se ha comentado en varias ocasiones el MSX inhibe la glutamina sintetasa provocando un déficit de glutamina, uno de los aminoácidos que dona los grupos amino; mientras que la rapamicina inhibe directamente a TORC1. Por lo tanto, ambos inhibidores simulan un ayuno de nitrógeno. Sin embargo, el efecto observado respecto a la fosforilación de Gln3p difiere. Mientras que el MSX aumenta la fosforilación de Gln3p, al igual que el ayuno de nitrógeno, la rapamicina disminuye su fosforilación. Sin embargo, experimentos de localización subcelular sitúan a Gln3p en el núcleo en ambas condiciones. El interés de seguir la fosforilación de Gln3p no reside en conocer cómo responden las cepas de laboratorio sino las cepas vínicas y observar si hay alguna diferencia en dicha respuesta. La obtención de extractos celulares totales con el fin de visualizar Gln3p mediante *western blot* para las cepas vínicas fue imposible, tal y como se muestra para la cepa M2 en el panel A de la Figura 65. Aunque únicamente se muestra el *western blot* realizado para la cepa M2, también se realizó para otras cepas vínicas como C9, EC1118, DV10 y CSM y en ningún caso se obtuvieron bandas claras al realizar la inmunodetección del epítipo MyC. Todos los *western blot* realizados mostraban una alta degradación de Gln3p a lo largo del experimento y a lo largo de las condiciones. La expresión de Gln3p es constitutiva por lo que la no observación de Gln3p en las cepas vínicas parece que no es debido a bajos niveles de Gln3p. Por ello, se optó por realizar la rotura de las células en presencia de ácido tricloroacético (TCA). Los resultados de la extracción con TCA se muestran en el panel B de la Figura 65. La diferencia entre los paneles A y el B reside en el método de extracción de las proteínas, rotura mecánica con perlas de vidrio (panel A) o TCA (panel B). Se observa una gran diferencia en las bandas obtenidas en ambos *western blot* sugiriendo que en cepas vínicas Gln3p es más inestable o su tasa de degradación es mayor que en las cepas de laboratorio. En el panel B, además se añadió la cepa C9 transformada con el plásmido pRS416 que presentaba *GLN3* etiquetada con MyC como control positivo. En las cuatro cepas analizadas puede observarse que tanto el ayuno de nitrógeno como el tratamiento con MSX aumentan la fosforilación de Gln3p, siendo mayor el aumento para MSX. Por el contrario, la rapamicina no solo disminuye su fosforilación, sino que también se observa una mayor intensidad de banda cuando el control de carga realizado con Pgk1p no muestra niveles más altos de proteína.

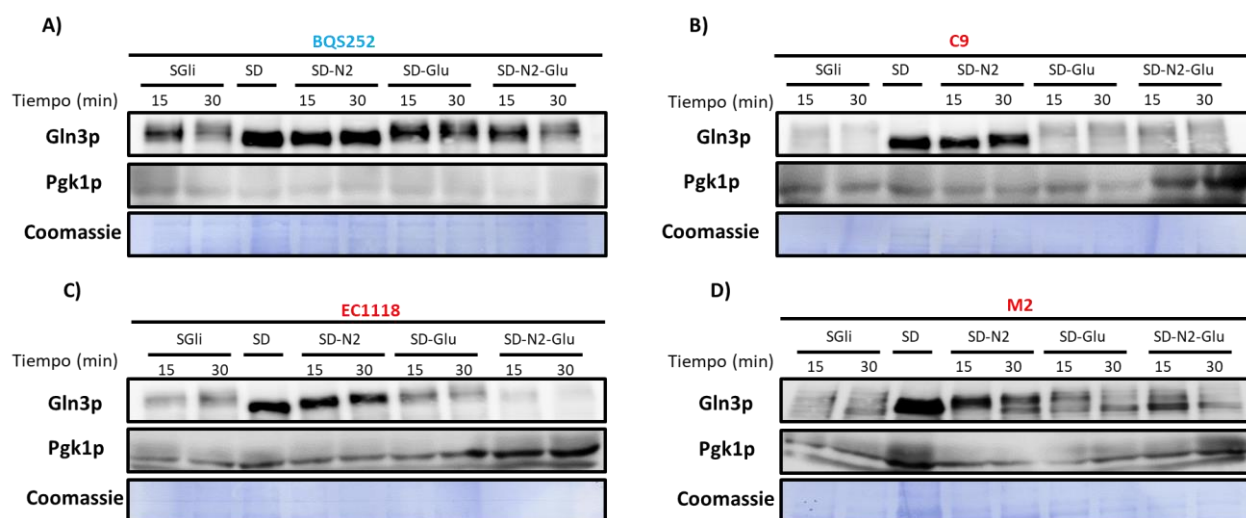
Para estudiar si la banda observada en medio SD y en el tratamiento con rapamicina coinciden con la proteína totalmente defosforilada se realizó el tratamiento con fosfatasa lambda (panel C). De esta forma, se produce la defosforilación completa de Gln3p y se observa a la proteína con su migración electroforética más baja. El tratamiento con lambda fosfatasa se realizó tanto en medio mínimo SD con la fuente de nitrógeno disminuida y en presencia de rapamicina únicamente para la cepa de laboratorio BQS252 y la cepa vínica EC1118, Figura 65, panel C. En ambas condiciones se observa que la banda correspondiente al tratamiento con la fosfatasa es más fina que la observada en el medio mínimo SD o en el tratamiento con rapamicina. No obstante, la migración electroforética no es tan grande como la observada con el tratamiento con MSX sugiriendo que en medio mínimo SD y en rapamicina se detecta la proteína Gln3p totalmente defosforilada.





**Figura 65.** Fosforilación de Gln3p en condiciones de laboratorio en cepas vínicas y cepas de laboratorio. *Western blot* realizado a partir de las proteínas obtenidas de las células creciendo en fase exponencial las cuales se transfirieron a medio mínimo sin nitrógeno (SD-N<sub>2</sub>), a medio mínimo con L-metionina sulfoximina (MSX, 2 mM) o con rapamicina (Rapa, 200 ng/mL) durante 20 min (A) y (B). Las proteínas se extrajeron con tampón de lisis (A) o mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (B), tal y como se indica en Materiales y Métodos. Las proteínas extraídas mediante precipitación con TCA se sometieron al tratamiento con lambda fosfatasa para defosforilar completamente la proteína Gln3p (C). La proteína Gln3p se inmunodetectó con un anticuerpo contra la etiqueta MyC. C: control. λPPase: tratamiento con fosfatasa lambda. Los medios de crecimiento se suplementaron con uracilo (20 mg/L) debido a la auxotrofia de la cepa de laboratorio BQS252. Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica.

Como se ha comentado en el apartado 6.3 de la Introducción, la fosforilación de Gln3p también depende de Snf1p y, por tanto, de la disponibilidad de glucosa. Bertram et al., (2002) demostraron que tanto TORC1 como Snf1p regulan la translocación de Gln3p al núcleo, aunque mediante mecanismos diferentes ya que TORC1 reprime la translocación al núcleo y Snf1p la induce. Para corroborar dichos resultados, se estudió la fosforilación de Gln3p en varias cepas vínicas cultivadas en glicerol como fuente de carbono (SGli), en ayuno de nitrógeno (SD-N<sub>2</sub>), en ayuno de glucosa (SD-Glu) y en ayuno de ambos (SD-N<sub>2</sub>-Glu), experimentos que se muestran en la Figura 66. El glicerol es una fuente de carbono no fermentable por lo que las células únicamente pueden utilizarla mediante respiración. La fosforilación de Gln3p aumenta en presencia de glicerol en todas las cepas analizadas, como se deduce de la menor movilidad electroforética a tiempo 15 minutos y 30 minutos en glicerol respecto del control SD. Tanto en las cepas vínicas (paneles B, C y D) como en la cepa de laboratorio (panel A), la mayor fosforilación de Gln3p en medio con glicerol, transcurridos 15 o 30 minutos, está asociada a una menor intensidad de banda, lo que sugiere degradación o inestabilidad de la proteína ya que los niveles de Pgk1p no varían entre el medio mínimo SD y la transferencia a glicerol. Frente al ayuno de glucosa, la fosforilación de Gln3p aumenta en los dos tiempos analizados. La intensidad de banda de Gln3p en la cepa BQS252 podría indicar una mayor cantidad de Gln3p en dichas condiciones.



**Figura 66.** Fosforilación de Gln3p en cepas vínicas y cepa de laboratorio en medio con glicerol o ayuno de ntrgeno. Las células se cultivaron en medio mínimo SD con 1 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta fase exponencial donde se dividieron en función de las condiciones analizadas. Las células se han transferido a medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono (SGli), a medio en ayuno de ntrgeno (SD-N2), a medio sin glucosa (SD-Glu) y a medio sin glucosa ni ntrgeno (SD-N2-Glu). Las extracciones de proteínas se realizaron mediante precipitación con ácido tricloroactido (TCA). La proteína se inmunodetect con un anticuerpo frente a la etiqueta MyC. Se usaron como controles de carga la inmunodetección de la proteína Pgk1p y la tinción con Coomassie. Se han analizado las cepas BQS252 (A), C9 (B), EC1118 (C) y M2 (D). Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

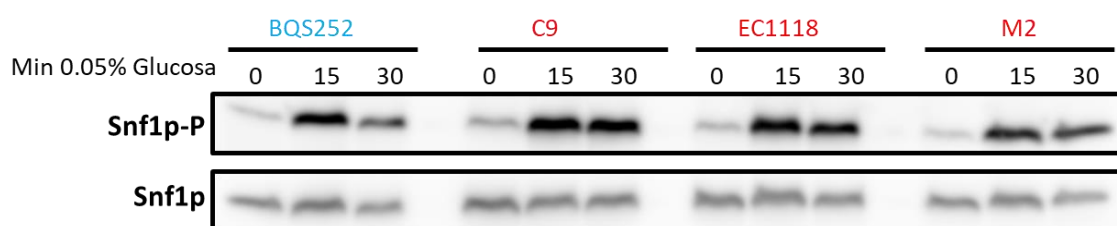
Al incubar las células en ausencia de glucosa y ntrgeno, el fenotipo observado es el mismo que para el ayuno de glucosa únicamente. Por lo tanto, frente a la falta de ntrgeno y glucosa, la respuesta celular es un aumento de la fosforilación de Gln3p. Estos resultados sugieren que la fosforilación de Gln3p también es dependiente de la fuente de carbono y, de hecho, es en ausencia de este nutriente donde se observan efectos más drásticos en las cepas vínicas, que parecen afectar no solo al estado de fosforilación sino también a la cantidad de proteína. Debido a la regulación conjunta por parte de TORC1 y Snf1p de la fosforilación de Gln3p, resultaría interesante comprobar si, tal y como se observa en Cox et al., (2002), los cambios producidos en los niveles de fosforilación de Gln3p en ayuno de carbono son dependientes de la fuente de ntrgeno.

#### 4.1.3. Estudio de la actividad de Snf1p mediante fosforilación

La represión catabólica por glucosa favorece el uso de la glucosa como fuente de carbono incluso en presencia de otras fuentes de carbono alternativas, a través de mecanismos de represión de la expresión de genes codificantes de proteínas implicadas en el uso de dichas fuentes alternativas. La 2-desoxiglucosa y glucosamina, ambos análogos no metabolizables de la glucosa, se han utilizado ampliamente para el estudio de la represión por glucosa ya que señalizan la presencia de la glucosa, pero al no ser metabolizables, no sustentan el crecimiento. Así pues, en presencia de fuentes de carbono alternativas y de dichos análogos, se puede estudiar la represión por glucosa. Debido a la diferente tolerancia frente a 2DG y GlcN entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio (Figura 16 y Figura 50 panel A) se procedió a estudiar la fosforilación de la proteína Snf1p, proteína clave implicada en los mecanismos de represión por glucosa. En ayuno de glucosa, Snf1p es fosforilada y activada permitiendo así la expresión de genes necesarios para el uso de fuentes de carbono

alternativas. Por ello, el análisis de la fosforilación de Snf1p es una herramienta para conocer el estado de activación de la ruta de represión por glucosa.

La represión catabólica por glucosa es muy severa y para observar una activación de Snf1p mediante fosforilación es necesario disminuir en gran medida la concentración de glucosa en el medio. Las células se cultivaron en medio completo YPD con 2 % de glucosa y en fase exponencial se cambiaron a un medio completo YPD con 0.05 % de glucosa, condiciones clásicas de desrepresión; las células se recogieron a 15 y 30 minutos. El estado de fosforilación de Snf1p se analizó por *western blot* inmunodetectando con un anticuerpo frente a la Thr210 fosforilada de la proteína Snf1p. Como control se utilizó un anticuerpo antipoli-His ya que Snf1p se caracteriza por tener una secuencia natural de 13 histidinas. Los resultados se muestran en la Figura 67, donde se observa que el cambio a una baja concentración de glucosa induce la fosforilación de Snf1p, tal y como se esperaba.



**Figura 67.** Fosforilación de la proteína Snf1p en condiciones de laboratorio. En fase exponencial, parte de las células se recogieron y parte se cambiaron a un medio completo YPD con 0.05 % de glucosa y se recogieron a 15 y 30 min. La extracción de proteínas se hizo por precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Se muestran los *western blot* inmunodetectando con el anticuerpo frente a Snf1p fosforilado (Snf1p-P) y frente a poli-His (Snf1p). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica.

Tanto en cepas vínicas como en la cepa de laboratorio, la activación de Snf1p es muy rápida y a 15 minutos ya se alcanza el máximo de fosforilación. En la cepa de laboratorio BQS252 la fosforilación de Snf1p transcurridos 30 minutos en 0.05 % de glucosa es menor que transcurridos 15 minutos, sugiriendo que las células responden rápidamente a la disminución de glucosa pero una vez inducida la respuesta para el uso de otras fuentes de carbono ésta se atenúa. Estos resultados están en concordancia con Orlova et al., (2006). La mayor fosforilación de Snf1p en las cepas vínicas a tiempo 30 minutos después del ayuno de glucosa podría indicar una mayor actividad de Snf1p lo que podría traducirse a una mejor adaptación a fuentes de carbono alternativas en condiciones de desrepresión. Sería necesario el estudio de factores transcripcionales regulados por Snf1p, como Mig1p o Adr1p para comprobar dicha hipótesis. En cualquier caso, la respuesta a la desrepresión por ausencia de glucosa es compartida por ambas cepas de levadura.

El análisis de la actividad de las rutas de señalización de nutrientes mediante las dianas anteriormente estudiadas muestran que las cepas vínicas responden a los estímulos químicos y nutricionales según está descrito en la bibliografía para las cepas de laboratorio, salvo en la fosforilación de Rps6p lo que puede explicar las diferencias de crecimiento frente a rapamicina. Así pues, el análisis de la fosforilación de dichas dianas puede utilizarse para conocer el estado de activación de las rutas de señalización de nutrientes en condiciones de vinificación.

## 4.2. Análisis de las rutas de señalización en condiciones de vinificación

En los experimentos descritos en el apartado 4.1 del Capítulo 1 se han analizado las rutas de señalización de nutrientes en condiciones de laboratorio con el objetivo no solo de poner a punto la metodología sino también de observar posibles diferencias entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio. A continuación, se procedió a ampliar los análisis a las condiciones de vinificación, donde realmente es relevante detectar comportamientos que impacten la eficiencia de las levaduras vínicas. Las condiciones de vinificación difieren en numerosos aspectos respecto a las condiciones de laboratorio, como se comentó en el apartado 4 de la Introducción pero los más importantes, a nivel de rutas de señalización de nutrientes, son la fuente de carbono y de nitrógeno.

El estado de activación de las rutas de señalización se estudió mediante detección de los niveles de fosforilación de proteínas clave, indicadoras del estado de actividad de dichas rutas, como se ha descrito en el apartado 4.1 del Capítulo 1. Para ello, se seleccionó la cepa BQS252 como cepa de laboratorio y la cepa EC1118 como cepa vínica y se llevaron a cabo dos vinificaciones en mosto sintético, una en MS300 y otra en MS60. La diferencia entre los dos mostos sintéticos utilizados reside en la concentración de nitrógeno asimilable ( $\alpha$ -aminoácidos y amonio). Tal y como indica su nombre, el MS300 presenta 300 mg/L de nitrógeno asimilable mientras que el MS60 solo una quinta parte, 60 mg/L, disminuyendo proporcionalmente el contenido en amonio y en aminoácidos. Mientras que el MS300 es un mosto rico en fuente de nitrógeno, el MS60 presenta la fuente nitrógeno limitante. Ambos mostos fueron suplementados con uracilo para permitir el crecimiento de la cepa de laboratorio BQS252.

A lo largo de la vinificación se recogieron muestras de células a diversos tiempos y también del sobrenadante para la determinación de los azúcares reductores y del nitrógeno asimilable, medida como  $\alpha$ -aminoácidos y amonio. El crecimiento durante la vinificación se siguió mediante recuento en placa de las u.f.c./mL. Para la inmunodetección de las proteínas Par32p y Gln3p se utilizó su etiqueta Myc por lo que fue necesario realizar dos vinificaciones independientes con las cepas etiquetadas para cada una de las proteínas. No se observó ningún defecto en la fermentación ni en el estado de activación de las rutas de señalización de nutrientes entre las cepas que presentaban la proteína Par32p etiquetada o la proteína Gln3p etiquetada, ambas con la proteína Myc y la cepa silvestre (datos no mostrados).

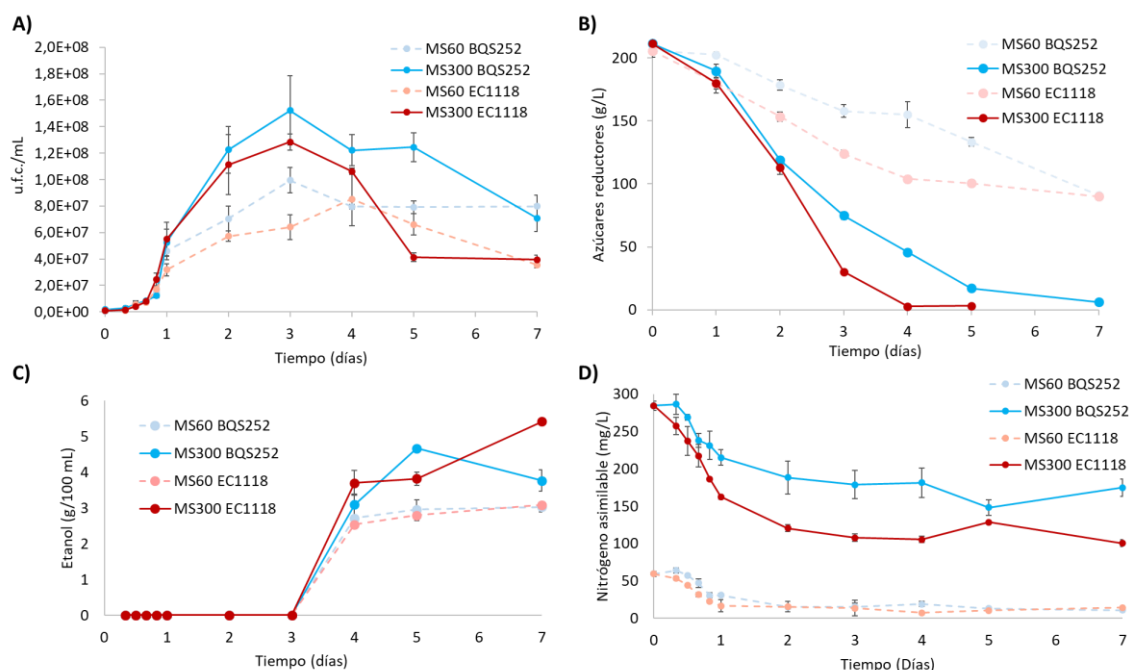
### 4.2.1. Seguimiento de la vinificación en MS60 y MS300

La Figura 68 muestra los resultados obtenidos para los parámetros de seguimiento de las vinificaciones, donde se observa que la escasez de nitrógeno del mosto MS60 limita el crecimiento de ambas cepas (panel A), en paralelo con un menor consumo de azúcares (panel B). Como consecuencia, también se observa una producción menor de etanol en el mosto MS60 que en MS300 (panel C). Estos efectos de la disponibilidad de nitrógeno son equivalentes para ambas cepas aunque la cepa vínica presenta una capacidad fermentativa mayor en ambas condiciones. En cuanto al consumo del nitrógeno asimilable (panel D), los resultados corroboran la limitación a lo largo de la fermentación en el MS60.

La tendencia del consumo de nitrógeno asimilable en ambas condiciones y en ambas cepas es la misma. La velocidad de consumo de nitrógeno es muy elevada a tiempos cortos y alrededor de 1 día de la fermentación alcohólica el consumo se ralentiza sin llegar a consumir del todo el nitrógeno (10 y 14 mg/L para BQS252 y EC1118 en MS60). Estos resultados sugieren que se produce algún cambio a partir de 1 día que impide el consumo de nitrógeno o se han rellenado todas las reservas, independientemente de si se encuentra en déficit o no.

Roustan y Sablayrolles (2004) también observaron esa parada en el consumo de nitrógeno en fermentaciones realizadas en mosto sintético, aunque la concentración de glucosa en sus experimentos era menor (100 g/L). Sin embargo, Beltran et al., (2004) demostraron que en MS60 y en MS300 el nitrógeno se consumía por completo a tiempo 1 día de fermentación, y únicamente un mosto sintético con una concentración elevada de nitrógeno (1200 mg/L) causaba una parada en su consumo a partir de 1 día de fermentación. A pesar de que la velocidad de consumo de nitrógeno se ralentiza mucho a partir de los 2 días de fermentación, el máximo de crecimiento de las levaduras se obtiene a tiempo 3 días indicando que las células son capaces de seguir creciendo a pesar de encontrarse con bajo nitrógeno extracelular y sugiriendo que existe un límite en el consumo o en las necesidades de nitrógeno.

Los aminoácidos son almacenados en la vacuola; de hecho, el 60 % del pool de aminoácidos presentes en células de *S. cerevisiae* se encuentra en la vacuola (Wiemken y Dürr, 1974). Además, tanto TORC1 como sus reguladores downstream (complejo EGO, Sch9p o Tap42p-Sit4p) se localizan en la vacuola, localización indispensable para la regulación del almacenamiento de nitrógeno en las vacuolas. Por otra parte, la localización de los activadores transcripcionales tipo GATA Gat1p y Gln3p también requiere a las proteínas vacuolares de clase C y D (Fayyadkazan et al., 2014). La ralentización en el consumo de nitrógeno observada a partir de 1 día de fermentación sugiere que el consumo tan elevado que se produce en las primeras horas de fermentación podría indicar un mecanismo de almacenaje de nitrógeno en la vacuola, dicho nitrógeno se movilizaría *a posteriori* para el metabolismo celular.



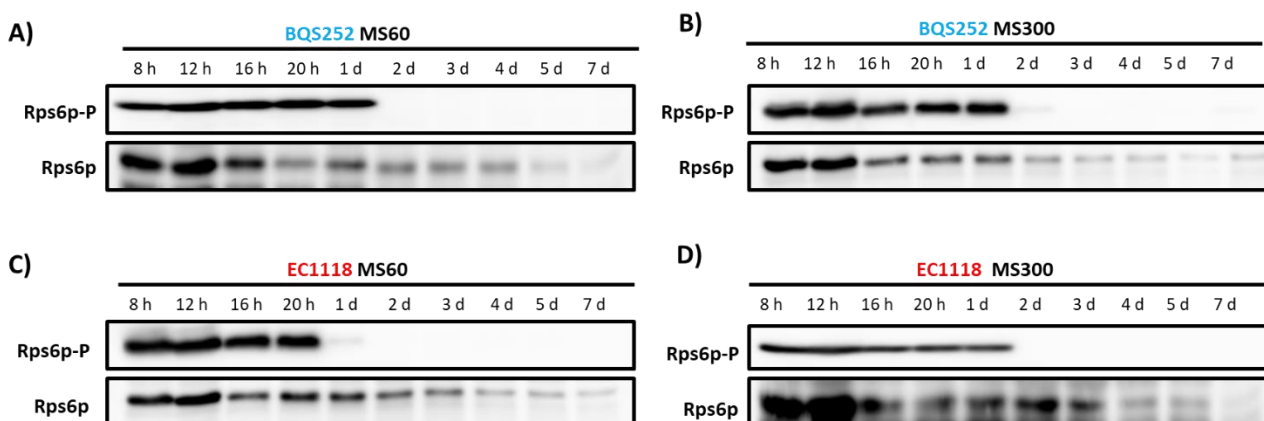
**Figura 68.** Cinéticas de las fermentaciones alcohólicas realizadas en MS60 y MS300 con las cepas BQS252 y EC1118. Curva de crecimiento en la que se representa las u.f.c./mL (A). Curva de consumo de azúcares reductores (g/L) (B). Producción de etanol (g/100 mL) (C). Curva de consumo de nitrógeno asimilable ( $\alpha$ -aminoácidos y amonio) (D). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas.

## 4.2.2. Estudio de la actividad del complejo TORC1

### 4.2.2.1. Análisis de la fosforilación de Rps6p

Como ya se ha comentado, la fosforilación de Rps6p es dependiente de la actividad de TORC1. En la Figura 69 se muestra el perfil de fosforilación de Rps6p en las dos cepas analizadas: BQS252 y EC1118, en las dos condiciones analizadas: MS60 y MS300. Únicamente se observa fosforilación de Rps6p hasta día 1 de fermentación para la cepa BQS252 en ambos medios y para la cepa EC1118 en el caso de MS300, mientras que en MS60 la proteína Rps6p deja de estar fosforilada un poco antes, tras 20 horas de vinificación. Respecto a la proteína Rps6p total se observa, en todas las cepas y condiciones, un decrecimiento en las intensidades de banda hasta no observar ningún tipo de señal. Al tratarse de una proteína ribosomal, su desaparición a lo largo de la fermentación podría estar indicando una disminución de la tasa global de traducción como consecuencia del ayuno de nutrientes, aunque también podría deberse a problemas de solubilidad en condiciones de fase estacionaria muy avanzada.

La fosforilación de Rps6p sugiere que la ruta TORC1 solo está activa a principio de la fermentación alcohólica. No se observan diferencias relevantes ni en la fosforilación ni en los niveles de proteína de Rps6p entre cepas vínicas y cepas de laboratorio.



**Figura 69.** Fosforilación de Rps6p como medida de la actividad de TORC1 en condiciones de vinificación. La cepa de laboratorio BQS252 (A y B) y la cepa vínica EC1118 (C y D) se inocularon tanto en MS60 (A y C) como en MS300 (B y D). Las células se recogieron a los tiempos indicados y las proteínas se extrajeron mediante ácido tricloroacético. Se muestran los *western blot* realizados contra Rps6p fosforilado (Rps6p-P) y Rps6p total. Azul: cepas de laboratorio. Rojo cepas vínicas.

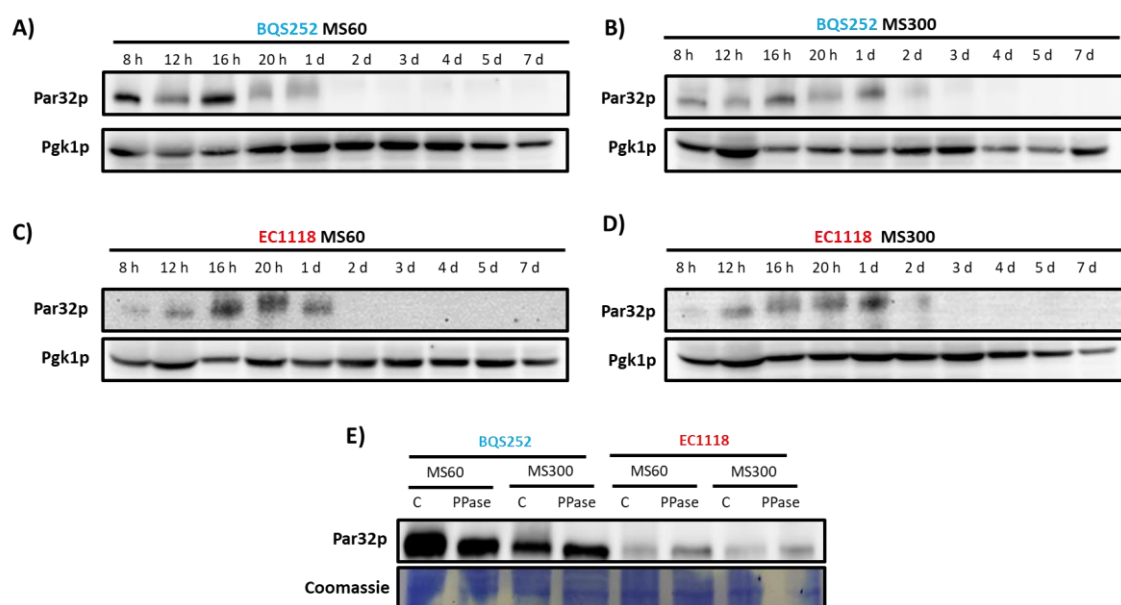
### 4.2.2.2. Análisis de la fosforilación de Par32p

La fosforilación de Rps6p sugiere que la ruta TORC1 solo está activa en las primeras horas de fermentación. Para corroborar dichos resultados también se analizó la fosforilación de Par32p en MS60 y MS300 en la cepa vínica EC1118 y la cepa de laboratorio BQS252 (Figura 70). Como ya se ha comentado, Par32p es una proteína que se fosforila después del tratamiento con rapamicina como consecuencia de la inhibición de TORC1, lo que permite la acción directa sobre ella de Npr1p (Varlakhanova et al., 2018).

En todas las vinificaciones realizadas se observa una disminución de la movilidad electroforética alrededor de las 16 h. Esa disminución de la movilidad se traduciría en un aumento de la fosforilación como consecuencia de la inactivación de TORC1. Por lo tanto, el análisis de la fosforilación de Par32p corrobora que la ruta TORC1 solo está activa en las primeras horas de fermentación. La menor acumulación de Par32p total en la cepa EC1118 en

MS60 podría deberse a una mayor degradación de la misma o a la interacción de Par32p en su forma defosforilada con las permeasas de amonio Mep1/3p cuando la fuente de nitrógeno es no preferida (Boeckstaens et al., 2015).

Para comprobar el estado inicial de fosforilación de Par32p en la vinificación se realizó un tratamiento con fosfatasa lambda de las muestras recogidas a 8 horas, Figura 70, panel E. La banda correspondiente al tratamiento con fosfatasa lambda se encuentra a la misma altura que la banda correspondiente a 8 horas de vinificación sin tratamiento en la cepa vínica EC1118. Sin embargo, en la cepa BQS252 la proteína Par32p parece estar ligeramente fosforilada al principio de la fermentación que en la cepa EC1118 pues la banda correspondiente a 8 horas (rotulada como C en el panel E de la Figura 70) no se encuentra a la misma altura que la del tratamiento con fosfatasa lambda. Como consecuencia, la fosforilación en la cepa BQS252 parece ser mayor. Estos resultados demuestran que Par32p, inicialmente defosforilada, aumenta su fosforilación a lo largo de la vinificación. No se observan diferencias ni entre las cepas analizadas ni entre las condiciones estudiadas; en todos los casos la fosforilación de Par32p máxima se produce alrededor del día 1, aunque en MS300 todavía se detecta la proteína a día 2, no observándose en MS60.



**Figura 70.** Fosforilación de Par32p como medida de la actividad de TORC1 en condiciones de vinificación. Las cepas BQS252 (A y B) y EC1118 (C y D) se inocularon tanto en MS60 (A y C) como en MS300 (B y D). Las células se recogieron a los tiempos indicados y las proteínas se extrajeron mediante ácido tricloroacético. Se muestra la inmunodetección de los *western blot* contra la etiqueta MyC (Par32p) y contra Pgk1p, como control de carga. Efecto del tratamiento con lambda fosfatasa sobre la movilidad electroforética en las muestras procedentes de la vinificación a tiempo 8 horas (E). Azul: cepas de laboratorio. Rojo cepas vínicas.

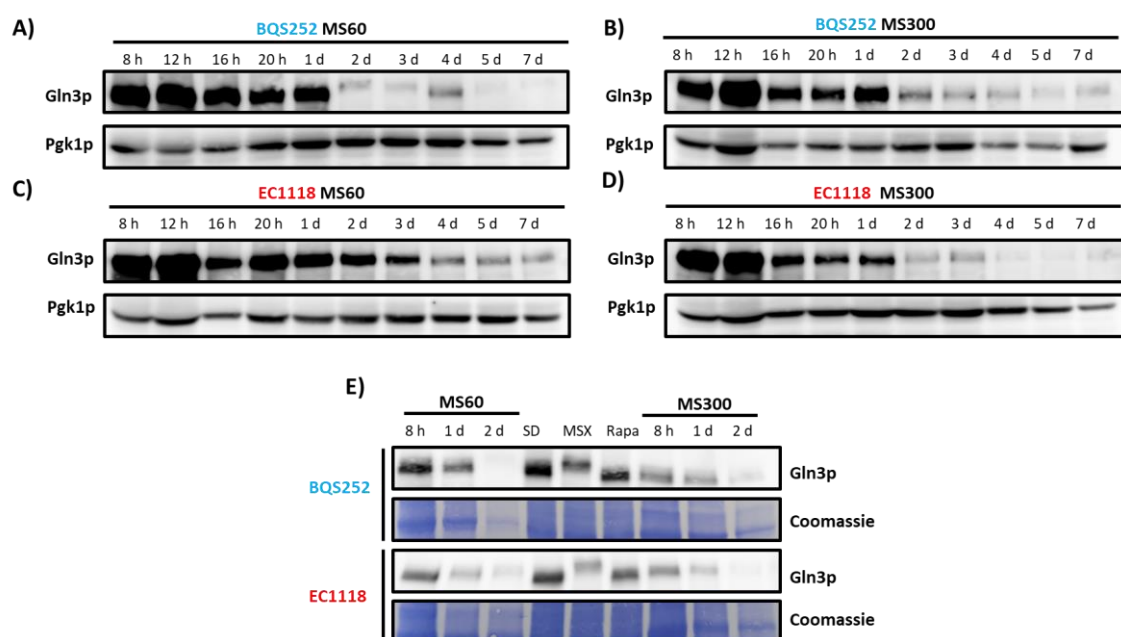


### 4.2.3. Estudio de la actividad de la represión catabólica por nitrógeno (NCR)

#### 4.2.3.1. Análisis de la fosforilación de Gln3p

Como en los experimentos descritos en el apartado 4.1 en condiciones de laboratorio, se abordó el estudio de la NCR en las condiciones de vinificación descritas en los subapartados previos a través del nivel de fosforilación de Gln3p cuyos resultados se muestran en la Figura 71.

La máxima cantidad de proteína, en estado defosforilado se observa entre las 8 y 12 horas para todas las condiciones. En EC1118 en MS300 los niveles son altos durante el primer día, tras lo cual la proteína es fosforilada y su cantidad disminuye. En MS60 la banda se observa a tiempos más largos, indicando que la cantidad de Gln3p responde al ayuno de nitrógeno. El patrón de la cepa BQS252 es más similar a lo que se observa para EC1118 en MS300, independientemente del mosto utilizado. A efectos comparativos, en el panel E de la Figura 71 se observa el cambio en la movilidad electroforética propiciado por los inhibidores MSX y rapamicina junto con el cambio inducido como resultado del proceso de fermentación alcohólica. En esta electroforesis se aprecia la fosforilación de Gln3p una vez transcurrido el primer día de vinificación. Además, la banda correspondiente a 8 horas de fermentación se comporta de manera similar a la tratada con rapamicina en condiciones de laboratorio, sugiriendo que inicialmente Gln3p se encuentra defosforilada al inicio de la vinificación. La fosforilación de Gln3p sugiere que la NCR está activa desde el inicio de la fermentación, incluso antes de que el nitrógeno se haya consumido (Figura 68, panel C).



**Figura 71.** Fosforilación de Gln3p como medida de la represión catabólica por nitrógeno (NCR) en condiciones de vinificación. Las cepas BQS252 (A y B) y EC1118 (C y D) se inocularon tanto en MS60 (A y C) como en MS300 (B y D). Las células se recogieron a los tiempos indicados y las proteínas se extrajeron mediante ácido tricloroacético. Se muestran la inmunodetección de los *western blot* realizados contra la etiqueta MyC (Gln3p) y contra Pgk1p, como control de carga. Comparación de la movilidad electroforética de Gln3p entre las muestras obtenidas de la vinificación y las muestras obtenidas del crecimiento en medio SD con tratamiento frente a MSX (2 mM) o rapamicina (200 ng/mL) (E). Azul: cepas de laboratorio. Rojo cepas vínicas.



Los resultados esperados para el nivel de fosforilación de Gln3p son distintos a lo observado en las condiciones de disponibilidad de fuentes preferentes de nitrógeno al inicio de la fermentación. Se esperaría un estado fosforilado para producirse posteriormente una defosforilación, característica del estado activo, a tiempos largos de fermentación cuando las fuentes de nitrógeno favoritas van disminuyendo hasta niveles críticos. Sin embargo, la mayor cantidad del factor transcripcional Gln3p a tiempos iniciales y el estado inicial defosforilado de Gln3p sugieren que se da una desrepresión de la NCR desde el inicio de la fermentación. Cabe también la posibilidad de que el estado de fosforilación de la proteína Gln3p en las células procedentes de precultivos en fase estacionaria en YPD genere artefactos en la detección a lo largo del inicio de la vinificación, aunque los tiempos son suficientemente largos para asegurar que la ruta se haya ajustado a las condiciones del medio.

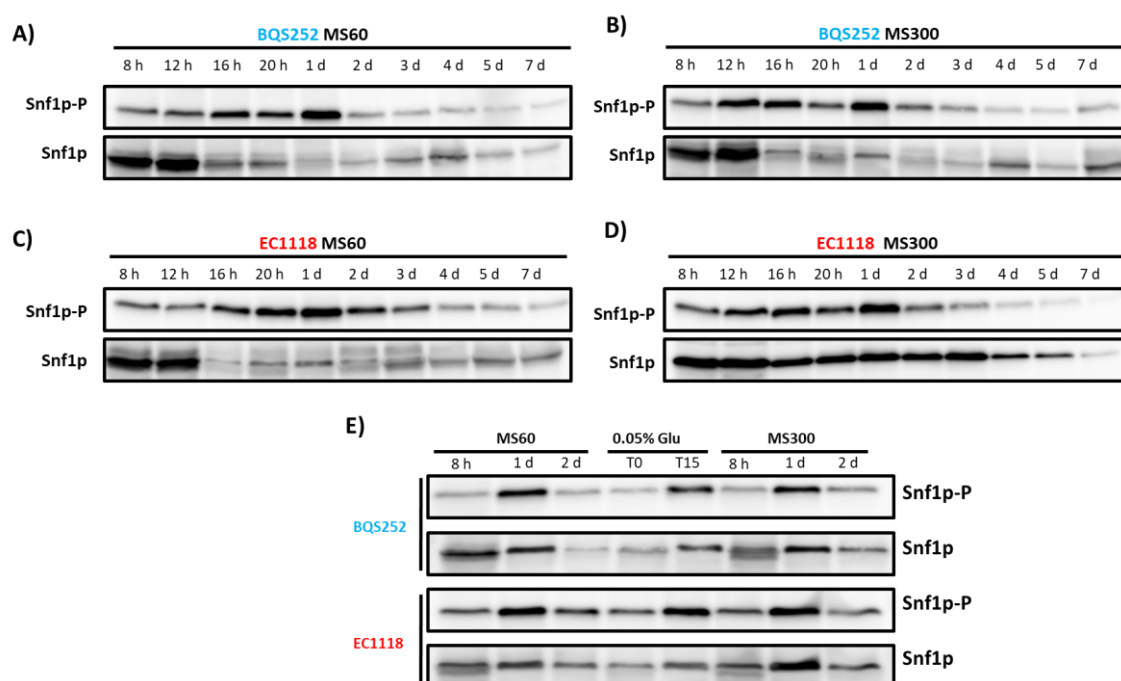
#### 4.2.4. Estudio de la actividad de Snf1p mediante fosforilación

El estado de fosforilación de Rps6p y Par32p sugiere que la ruta TORC1 está activa solo en las primeras horas de fermentación vinica mientras que la fosforilación de Gln3p indica que la NCR se activa desde el inicio de la fermentación, conclusiones consistentes entre sí aunque, *a priori*, esos resultados no concuerdan con lo descrito en condiciones de laboratorio, ya que a dichos tiempos de fermentación la levadura dispone de nitrógeno suficiente y sigue creciendo hasta alcanzar el máximo de crecimiento a los 3 días de fermentación, aproximadamente.

Con el fin de investigar el estado de la señalización de disponibilidad de glucosa en esas condiciones, se ha estudiado en las cepas y condiciones de vinificación descritas en apartados anteriores, el nivel de fosforilación de la proteína quinasa Snf1p, cuya activación en condiciones de baja concentración de glucosa es consecuencia de su fosforilación (McCartney y Schmidt, 2001). La inmunodetección se ha realizado con un anticuerpo frente a la Thr210 fosforilada de Snf1p y con un anticuerpo frente una región natural de poliHis característica de Snf1p para detectar la proteína Snf1p total, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 72. Como puede observarse, la proteína Snf1p también está activa en las primeras horas de fermentación a pesar de la gran abundancia de azúcares fermentables presentes a dicho tiempo (Figura 68, panel B). Se detecta un pico de fosforilación de Snf1p alrededor de las 24 horas en todas las condiciones y se sigue observando Snf1p fosforilado y, por tanto, activo, un par de días más. Esa activación prolongada de Snf1p podría responder a las condiciones de estrés que aparecen como consecuencia de la fermentación, como por ejemplo, el estrés osmótico. Aunque en todas las condiciones analizadas el pico de fosforilación se observa a tiempo 1 día, en MS60 se aprecia un cierto retraso, mientras que en MS300, independientemente de la cepa, el aumento de la fosforilación ya se observa a 12 horas. Por otra parte, la defosforilación de Snf1p es más rápida en la cepa BQS252 que en la cepa EC1118 en MS60. La rápida defosforilación de Snf1p en la cepa BQS252 respecto de las cepas vnicas también se observó en condiciones de laboratorio (Figura 67). La intensidad de banda correspondiente a la cepa BQS252 entre el tiempo 2 días y 7 parece ser la misma; se produce una defosforilación muy rápida de tiempo 1 día a 2 días de fermentación. Sin embargo, esa defosforilación de Snf1p en la cepa EC1118 se produce de forma más paulatina hasta tiempo 7 días. Respecto a la proteína total, la cantidad de Snf1p total es mayor en EC1118 en MS300 a tiempos más largos que en MS60 mientras que para la cepa de laboratorio BQS252 la cantidad de Snf1p total es muy similar entre los dos tipos de mosto analizados.

Dado que la fosforilación de Snf1p responde principalmente a la concentración de glucosa presente en el medio, tal y como se ha corroborado anteriormente (Figura 67), se analizó su estado de fosforilación en muestras procedentes de un cambio a condiciones de desrepresión

en medio completo YPD (tiempo 0 y 15 min), junto con las muestras procedentes de la vinificación para poder comparar los niveles de activación de la quinasa Snf1p (Figura 72, panel E). A tiempo 1 día de fermentación los niveles de activación de Snf1p son muy similares a los obtenidos transcurridos 15 minutos en YPD con 0.05 % de glucosa, lo que corrobora que se produce la activación completa de Snf1p en condiciones de vinificación. Transcurridas 8 horas de fermentación, los niveles de Snf1p de la cepa EC1118 parecen ser ligeramente mayores que para los del control negativo (tiempo 0 en 0.05 % de glucosa); mientras que la cepa BQS252 a tiempo 8 horas presenta Snf1p completamente inactivo. Estos resultados podrían explicar la diferente tolerancia respecto a la 2-deoxiglucosa entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio (Figura 16 y Figura 50, panel A), ya que la mayor activación de Snf1p en condiciones clásicas de total represión por glucosa indica una cierta relajación de dicha represión en cepas vínicas, lo que permitiría un mejor crecimiento en fuentes alternativas de carbono en presencia de este análogo no metabolizable de la glucosa.



**Figura 72.** Fosforilación de Snf1p en condiciones de vinificación. Las cepas BQS252 (A y B) y EC1118 (C y D) se inocularon tanto en MS60 (A y C) como en MS300 (B y D). Las células se recogieron a los tiempos indicados y las proteínas se extrajeron mediante ácido tricloroacético. Se muestran las inmunodetecciones contra Snf1p fosforilado (Snf1p-P), utilizando un anticuerpo que reconoce la Thr210, y contra Snf1p total (Snf1p) utilizando un anticuerpo que reconoce poli-His. Comparación de la fosforilación de Snf1p y Snf1p total entre muestras procedentes de vinificación y muestras procedentes de crecimiento en medio completo YPD y transferidas a YPD con 0.05 % de glucosa (E). Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

La fosforilación de Snf1p sugiere que la ruta SNF1 también está activa en las primeras horas de vinificación. Se ha determinado que la activación de Snf1p es también sensible a las condiciones de estrés típicas del inicio de la vinificación, como el estrés hiperosmótico, pudiendo dar lugar a un cierto nivel de activación de la quinasa Snf1p, a pesar de la gran abundancia de azúcares presentes en el mosto. Aunque en condiciones de estrés osmótico por sorbitol no se induce la fosforilación y activación de Snf1p (Hong y Carlson, 2007), el estrés

osmótico en vinificación, debido a la altísima concentración de azúcares podría desencadenar vías de señalización diferentes.

#### 4.2.5. Estudio de la actividad de Ras/cAMP/PKA

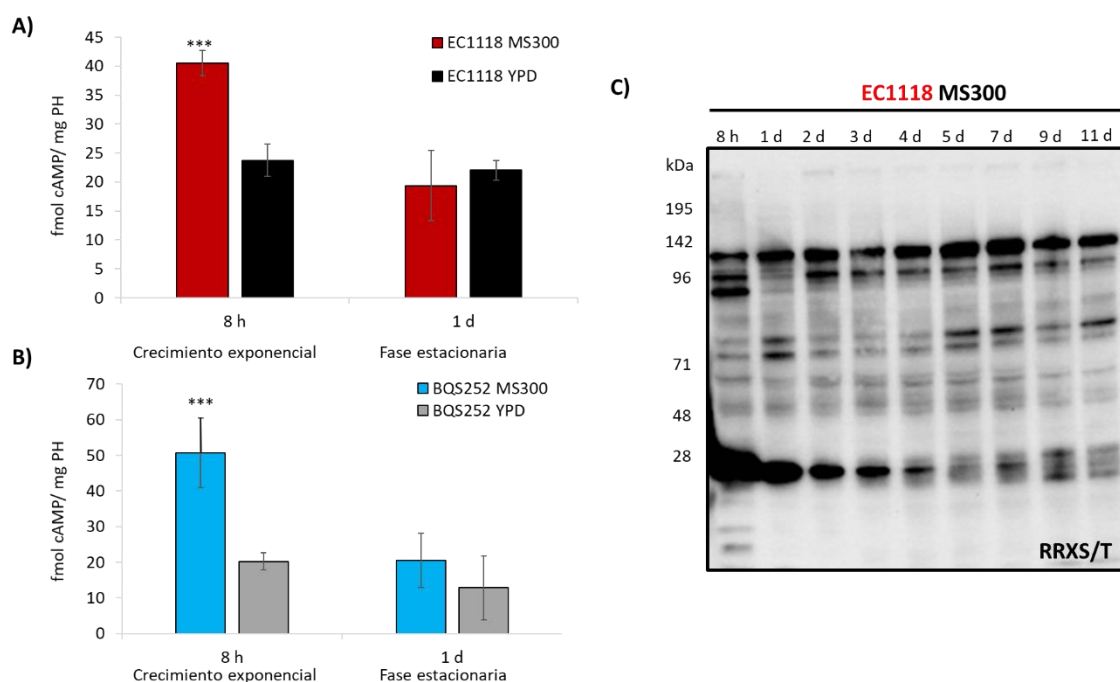
La ruta Ras/cAMP/PKA se conoce como regulador central a nivel transcripcional del estado metabólico de la célula (Zaman et al., 2008). PKA promueve el crecimiento y la división celular en presencia de glucosa y sus dianas engloban procesos muy diversos lo que dificulta el estudio de su actividad. Su activación es desencadenada por niveles elevados de cAMP, a través de la liberación de su subunidad reguladora Bcy1p de sus subunidades catalíticas Tpk1/2/3p.

El estudio del estado de fosforilación de las numerosas proteínas diana de la ruta requiere del etiquetado de la proteína de interés y su posterior inmunoprecipitación, y la inmunodetección con un anticuerpo contra el patrón de fosforilación característico de PKA. La dificultad del proceso de inmunoprecipitación en condiciones de vinificación debido a la elevada degradación de proteínas presentes complica el seguimiento de la actividad de PKA. Se han descrito en la bibliografía distintas alternativas para evaluar la actividad de PKA en condiciones específicas, como la descrita por Schepers et al., (2012) donde hicieron uso de un anticuerpo no comercial dirigido hacia los dos sitios de fosforilación de la trehalasa (Ser21 y Ser83), o por Graef y Nunnari, (2011) donde modificaron la colina quinasa *CKI*, una de las principales dianas de PKA, de forma que su fosforilación solo dependiese de PKA. Sin embargo, ninguna de esas opciones es fiablemente adaptable al estudio en condiciones de vinificación.

Debido a la dificultad de seguimiento de la actividad de PKA, se siguieron dos aproximaciones diferentes. Por un lado, se midieron los niveles de cAMP y, por otro, se analizó el perfil de proteínas que presentan el patrón de fosforilación característico de PKA, utilizando una inmunodetección de su motivo de fosforilación RRXS/T. Los resultados de ambos estudios se muestran en la Figura 73. Los niveles de cAMP vienen determinados por la actividad de la adenilato ciclasa Cyr1p, enzima que transforma ATP en cAMP. La degradación de cAMP viene determinada por las fosfodiesterasas Pde1/2p. A su vez, la actividad de Cyr1p es estimulada por las proteínas G Ras1/2p y Gpr1p. Niveles elevados de cAMP son capaces de liberar la subunidad reguladora Bcy1p de PKA de sus subunidades catalíticas Tpk1/2/3p dando lugar a su activación. Por lo tanto, los niveles de cAMP sirven de indicadores de condiciones celulares propicias para la activación de PKA.

El cAMP se midió mediante kit comercial en las muestras procedentes de vinificaciones con las cepas BQS252 y EC1118, a 8 horas y a 1 día de fermentación en MS300 y también en muestras procedentes de medio completo YPD en fase exponencial y en fase estacionaria. En los paneles A y B de la Figura 73, se observa una acumulación mucho menor de cAMP a las 8 horas en medio YPD que en MS300, mientras que en fase estacionaria los niveles son similares. En las dos cepas analizadas, se produce una reducción aproximadamente del 60 % de los niveles de cAMP entre las 8 horas y el primer día de fermentación en MS300, mientras que la reducción entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento en medio YPD es solo del 36 % en la cepa BQS252 y del 7 % en la cepa EC1118. También cabe destacar que los niveles de cAMP en fase estacionaria en medio YPD en la cepa EC1118 son mayores que los observados para la cepa BQS252, lo que podría indicar una actividad PKA mayor y, por tanto, una mejor adaptación al medio de crecimiento. La mayor acumulación inicial de cAMP en MS300 que en medio YPD sugiere que la menor concentración de glucosa en este último determina una menor actividad de la ruta Ras/cAMP/PKA.

Además, se analizó el perfil de proteínas fosforiladas por PKA en las muestras procedentes de la vinificación en MS300 con la cepa EC1118 utilizando un anticuerpo anti-RRXS/T, que detecta el patrón de fosforilación característico de PKA. El *western blot* se muestra en el panel C de la Figura 73. Ciertas bandas se mantienen a lo largo de la vinificación mientras que otras aumentan o disminuyen lo que indica que la ruta Ras/cAMP/PKA se encuentra activa, al menos en lo que respecta a ciertos sustratos, al contrario de lo observado con las anteriores rutas de señalización de nutrientes, y que no todas las proteínas se encuentran defosforiladas a tiempos largos de vinificación. La señalización a través de la ruta Ras/cAMP/PKA permanece activa, al menos para algunas dianas, a lo largo de todo el proceso de vinificación, tal y como se espera al responder específicamente a los azúcares fermentables presentes en el mosto sintético.



**Figura 73.** Análisis del estado de actividad de la ruta Ras/cAMP/PKA a través de los niveles de cAMP y del perfil de proteínas fosforilables por PKA. Niveles de cAMP respecto al peso húmedo (PH) en mosto sintético MS300 y en medio YPD a 8 h y 1 día de crecimiento en la cepa vínica EC1118 y la cepa de laboratorio BQS252, respectivamente (A) y (B). *Western blot* de las proteínas obtenidas durante la vinificación de la cepa EC1118 en MS300 utilizando el anticuerpo anti-RRXS/T que reconoce la secuencia de fosforilación por PKA (C). Se muestran valores medios y las desviaciones típicas. Análisis estadístico realizado mediante la prueba t-Student entre los diferentes medios de crecimiento. \*\*\*: P-valor  $\leq 0.005$ .

La identificación de alguna de las dianas cuya fosforilación dependiese de la actividad de PKA permitiría estudiar de forma más factible la actividad de dicha ruta, como se hizo previamente con otras rutas de señalización de nutrientes. En la Tabla 9 se muestran los sustratos de PKA cuya fosforilación se ha descrito que depende de PKA a través del motivo de fosforilación RRXS/T, motivo que reconoce el anticuerpo utilizado en el experimento de la Figura 73, panel C. En azul se muestran aquellas dianas cuya fosforilación aumenta vía PKA (Budovskaya et al., 2005) y en naranja aquellas proteínas cuya fosforilación a través de PKA disminuye bajo tratamiento con rapamicina (Soulard et al., 2010). Teniendo en cuenta el tamaño molecular de las bandas mostradas en el *western blot* de la Figura 73, se seleccionaron las siguientes proteínas Maf1p, Lhp1p, Cki1p, Ypk3p, Atg18p y Bcy1p como posibles dianas

cuya fosforilación es dependiente de PKA a través del motivo RRXS/T. Se construyeron mutantes de delección en los genes codificantes de dichas proteínas diana y se analizó el perfil de proteínas fosforiladas por PKA en las mismas condiciones que en el experimento de la Figura 73, panel C. En ningún mutante de delección analizado se observó la desaparición de ninguna banda al compararlo con la cepa silvestre (datos no mostrados). Los mutantes se construyeron en la cepa vínica haploide C9, cuyo patrón de fosforilación fue similar al obtenido para la cepa EC1118.

**Tabla 9.** Sustratos de PKA cuya fosforilación se ha descrito que depende de la proteína quinasa PKA a través del motivo de fosforilación RRXS/T. Azul: sustratos candidatos de PKA identificados en Budovskaya et al.(2005). Naranja: sustratos candidatos de PKA después del tratamiento con rapamicina identificados en Soulard et al. (2010). \*: candidatos seleccionados para análisis posteriores.

Peso Molecular (kDa)	Gen	Función
197	RIM15	Proteína quinasa implicada en la proliferación celular en respuesta a nutrientes
190	GCN2	Proteína quinasa que fosforila eIF2 $\alpha$ en respuesta al ayuno
140	SSD1	Represor transcripcional con papel en el crecimiento polarizado y la integridad de pared
122	IFH1	Coactivador regulador de la transcripción de genes de proteínas ribosomales (RP)
120	KCS1	Inositol hexaquisfosfato e inositol heptaquisfosfato quinasa
117	KSP1	Serin/treonin proteína quinasa, asociado con TORC1, regulador negativo de la autofagia
110	MNR2	Proteína de membrana vacuolar requerida para la homeostasis de magnesio
104	SYG1	Proteína de membrana plasmática de función desconocida
102	ATG1	Serin/treonin proteína quinasa necesaria para la formación de vesículas en autofagia
98	STB2	Proteína que interacciona formando un complejo con Sin3p y Stb1p
95	PSP1	Proteína rica en Asn y Gln de función desconocida
95	VTC2	Subunidad reguladora del complejo chaperona transportador vacuolar (VTC)
91	YAK1	Serin/treoninquinasa componente del sistema de detección de la glucosa
89	STB6	Proteína de función desconocida que se une a Sin3p
85	FRA1	Proteína implicada en la transcripción del regulon de hierro
83	ATG13	Subunidad reguladora del complejo de señalización Atg1p
78	MSN2	Activadores transcripcional de respuesta a estrés
75	SFP1	Regula la transcripción de proteínas ribosomales
71	WHI4	Proteína putativa de unión a RNA
68	ECM3	Proteína no esencial de función desconocida
66	CKI1*	Colinquinasa
65	AVT1	Transportador vacuolar
65	CST6	Factor transcripcional implicado en la respuesta a estrés
65	MKS1	Regulador transcripcional pleiotrópico negativo
63	CUB1	Gen relacionado con la reparación del DNA y la función del proteasoma

Peso Molecular (kDa)	Gen	Función
63	TPH3	Proteína putativa de función desconocida
60	YPK3*	AGC quinasa fosforilada por PKA de manera dependiente de TORC1
56	STB3	Proteína de unión a elementos procesadores de RNA ribosomal
55	ATG18*	Proteína de unión de fosfoinositida
47	BCY1*	Subunidad reguladora de PKA
44	MAF1*	Regulador negativo altamente conservado de la RNA polimerasa III
32	LHP1*	Proteína de unión a RNA necesaria para la maduración de tRNA y U6 snRNA

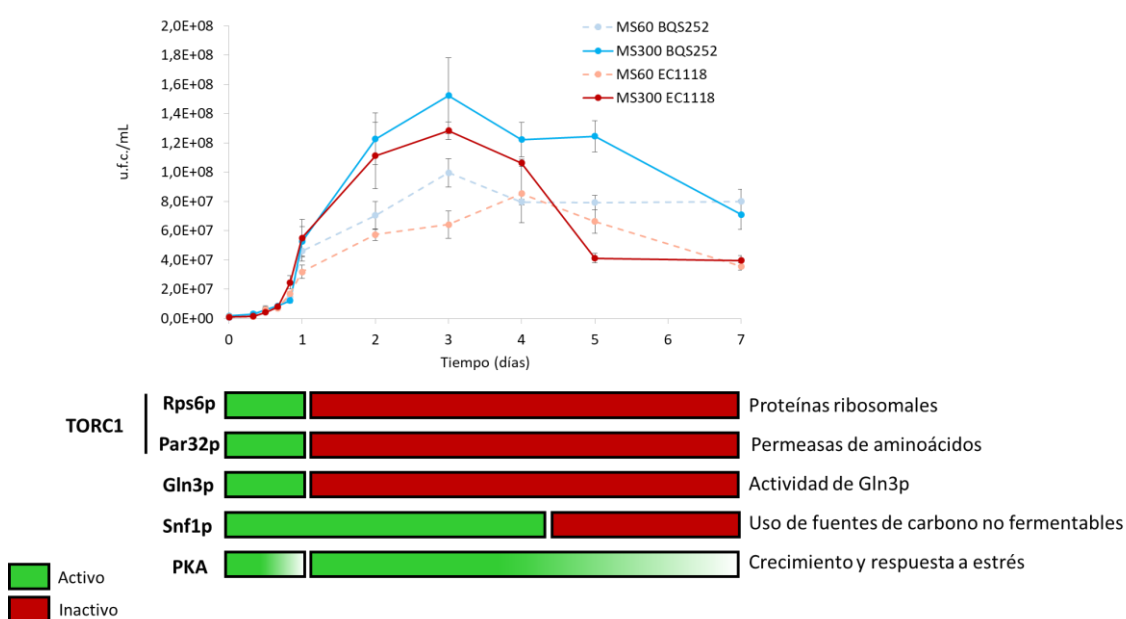
#### 4.3. Conclusión sobre el estado de las rutas de señalización durante la vinificación

La detección de los nutrientes presentes en el medio y la señalización intracelular que desencadenan son procesos altamente coordinados, con efectos fisiológicos que permiten la adaptación de las levaduras a cambios en su disponibilidad, tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de fermentaciones industriales. De ahí el interés de estudiar la actividad de las rutas de señalización de nutrientes, no solo para conocer cómo se orquesta esa compleja comunicación cruzada entre todas las rutas que posibilita la supervivencia en condiciones ambientales cambiantes, sino también para diseñar estrategias de mejora de la eficiencia de las levaduras que llevan a cabo fermentaciones alcohólicas de interés alimentario o en otros ámbitos biotecnológicos.

Al inicio de este primer capítulo se determinó la existencia de importantes diferencias entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio en su respuesta frente a inhibidores químicos que afectan a su crecimiento (Figura 14 y Figura 15). La mayor tolerancia de las cepas vínicas a rapamicina y a 2-deoxiglucosa (Figura 16) sugería una regulación diferente de la ruta TORC1, por ser directamente inhibida por la rapamicina, y de la ruta SNF1, por estar relacionada con la represión catabólica por glucosa. Esas diferencias de respuesta se han corroborado con el estudio de la fosforilación de la proteína ribosomal Rps6p, diana de una de las ramas de la ruta TORC1 (Figura 60). Mientras que las cepas de laboratorio presentaban la ruta TORC1 completamente inhibida en presencia de rapamicina (Rps6p no fosforilado), las cepas vínicas aún presentaban una cierta fosforilación residual de Rps6p, indicadora de una activación parcial de dicha ruta. No obstante, no se observaron más fenotipos diferenciales frente a otros inhibidores químicos analizados, lo que indica que el efecto está restringido a la actividad de TORC1 frente a estímulos determinados, y no a una actividad constitutiva diferente. El estudio de la fosforilación de Gln3p (Figura 65) ha corroborado, tal y como está descrito en la bibliografía (Kulkarni et al., 2006; Tate y Cooper, 2013), que el ayuno de nitrógeno causado por la eliminación de nitrógeno del medio (SD-N2) o bien por la inhibición de la glutamina sintetasa (MSX, L-metionina sulfoximina) no causan el mismo fenotipo sobre este regulador de la NCR. En ningún caso se observó una respuesta diferencial entre la cepa de laboratorio BQS252 y las cepas vínicas EC1118 y M2 en condiciones de laboratorio.

A continuación, se determinó mediante el estudio de la fosforilación de proteínas diana el estado de activación de las principales rutas de señalización en condiciones de vinificación. La Figura 74 muestra un resumen de los resultados obtenidos. La ruta TORC1 se encuentra activa únicamente en las primeras horas de fermentación, detectándose los efectos de su

inactivación muy tempranamente, cuando las células aún disponen de nitrógeno en el medio y han consumido únicamente una quinta parte de los azúcares presentes inicialmente en el mosto. Snf1p se activa también durante los primeros días de fermentación a pesar de la elevada concentración de azúcares. Además, la máxima densidad celular se alcanza alrededor del tercer día de fermentación, indicando que debe existir algún tipo de señalización que permite el crecimiento de las levaduras. Para corroborarlo se estudió la ruta Ras/cAMP/PKA mediante el estudio de las proteínas que son fosforiladas por PKA. Esto indica que existen sustratos de activación tardía a la vez que los hay que son propios de las etapas iniciales. Al ser PKA la única ruta de señalización de nutrientes activa parece que es la ruta central que regula a las demás y que la presencia de azúcares es el determinante que gobierna la actividad de las levaduras vínicas.



**Figura 74.** Resumen del estado de activación de las principales rutas de señalización de nutrientes en condiciones de vinificación.

En todas las vinificaciones realizadas se observó cierta degradación de proteínas totales mediante tinción con Coomassie (datos no mostrados). En condiciones de ayuno de nitrógeno, las proteínas celulares son una fuente importante de nitrógeno y su degradación permite redirigir las fuentes de nitrógeno a aquellos procesos celulares que sean imprescindibles para el metabolismo celular. De hecho, Orozco et al., (2012a) demostraron que la cepa vínica EC1118 presenta degradación por autofagia, medido a través de los niveles de la aldehído deshidrogenasa citosólica Ald6p, lo que puede explicar un crecimiento más rápido como consecuencia de la reorganización de las estructuras celulares. Esa autofagia podría ser primordial para la supervivencia en condiciones de vinificación. De hecho, aunque se explicará con más detalle en el siguiente capítulo, se ha observado la aparición de fragmentos de GFP procedentes de construcciones de fusiones génicas para el etiquetado de proteínas a partir del tiempo 4 de vinificación, lo sugiere que la autofagia también tiene lugar en condiciones de vinificación (Vallejo et al., 2017a)

Otro de los aspectos que merece especial atención es la parada en el consumo de nitrógeno asimilable, independientemente de la concentración inicial (MS60 o MS300) y de la cepa analizada (BQS252 o EC1118) (Figura 68 panel D). La velocidad de consumo de YAN

empieza a disminuir a partir de 1 día de fermentación, momento en el que también se observa un aumento de la fosforilación de Gln3p, su inactivación y, por tanto, una activación de la NCR. La desrepresión de la NCR en las primeras etapas de la fermentación corrobora los resultados obtenidos por Crépin et al., (2017) donde observan una acumulación de arginina en las vacuolas en las primeras horas de crecimiento. Por otra parte, la parada completa en el consumo de YAN coincide con el disparo en los niveles de etanol (Figura 68 panel C). El aumento de la concentración de etanol modifica la permeabilidad de la membrana celular y con ello, afecta a los transportadores de membrana, como por ejemplo Gap1p, la permeasa general de aminoácidos (Leao y Van Uden, 1983). Numerosos trabajos han determinado que la vacuola es capaz de almacenar aminoácidos (Kitamoto et al., 1988; Wiemken y Dürr, 1974) aunque el transporte a la vacuola depende de la naturaleza del aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos básicos suelen almacenarse en la vacuola mientras que el glutamato y el aspartato se encuentran únicamente en el citoplasma (Kitamoto et al., 1988). Los aminoácidos almacenados en la vacuola pueden utilizarse para la síntesis *de novo* de proteínas o bien como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos concretos. Crépin et al., (2014) demostraron que las diferencias observadas en la producción de biomasa durante la fermentación alcohólica se debían al uso más eficiente del nitrógeno presente en la vacuola. Estos resultados parecen indicar la importancia de hacer acopio de fuentes de nitrógeno, aun cuando éstas no son escasas, para poder así distribuir el nitrógeno hacia procesos celulares específicos. La parada en el consumo de YAN podría deberse a una alteración en los mecanismos de transporte debido a la toxicidad del etanol o a una elevada acumulación de fuentes de nitrógeno que señalicen la detención de dicho consumo.

El conjunto de todos los resultados mostrados deja claro que la coordinación entre las rutas de señalización de nutrientes es importante porque permite integrar diferentes señales, como el ayuno de nitrógeno o la elevada concentración de azúcares presentes en el mosto, para responder a las condiciones ambientales tan específicas que se producen durante la fermentación alcohólica del mosto. Aunque de gran interés, la dificultad del estudio de las rutas de señalización reside en la elevada comunicación cruzada entre las rutas.





## Capítulo 2

### PAPEL DE LAS PROTEÍNAS QUE FORMAN PARTE DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE NUTRIENTES EN CONDICIONES DE VINIFICACIÓN.

En el capítulo anterior se hizo énfasis en las diferencias observadas entre las cepas de laboratorio y las cepas vínicas; sin embargo, este capítulo se centra en las diferencias fenotípicas observadas en los mutantes de factores clave de diversas rutas en cepas vínicas en condiciones de vinificación. Las cepas vínicas presentan una elevada diversidad fenotípica en su comportamiento durante la fermentación alcohólica, y en particular, en sus requerimientos de fuente de nitrógeno lo que conlleva su clasificación en función de los mismos. Tanto la ruta TOR como el control general de aminoácidos (GAAC) responden a la fuente de nitrógeno por lo que se ha abordado el estudio de la implicación de ambas rutas en condiciones de vinificación, así como de los activadores transcripcionales tipo GATA, implicados en la NCR, en diversas cepas. En concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde la ruta Ras/cAMP/PKA parece ser la ruta central que regula a las demás, se ha planteado el estudio del papel de las proteínas que forman parte de dicha ruta, junto con la ruta SNF1 y la ruta retrógrada, mediante la obtención de mutantes de delección. De este modo, se ha profundizado en la conexión entre las rutas de señalización de nutrientes y su relevancia en condiciones de vinificación, utilizando una aproximación común basada en la modificación genética de factores relevantes para la transmisión de las señales relativas a la abundancia o a la escasez de nutrientes y el análisis de su impacto en el fenotipo de las levaduras en diversas cepas o fondos genéticos.

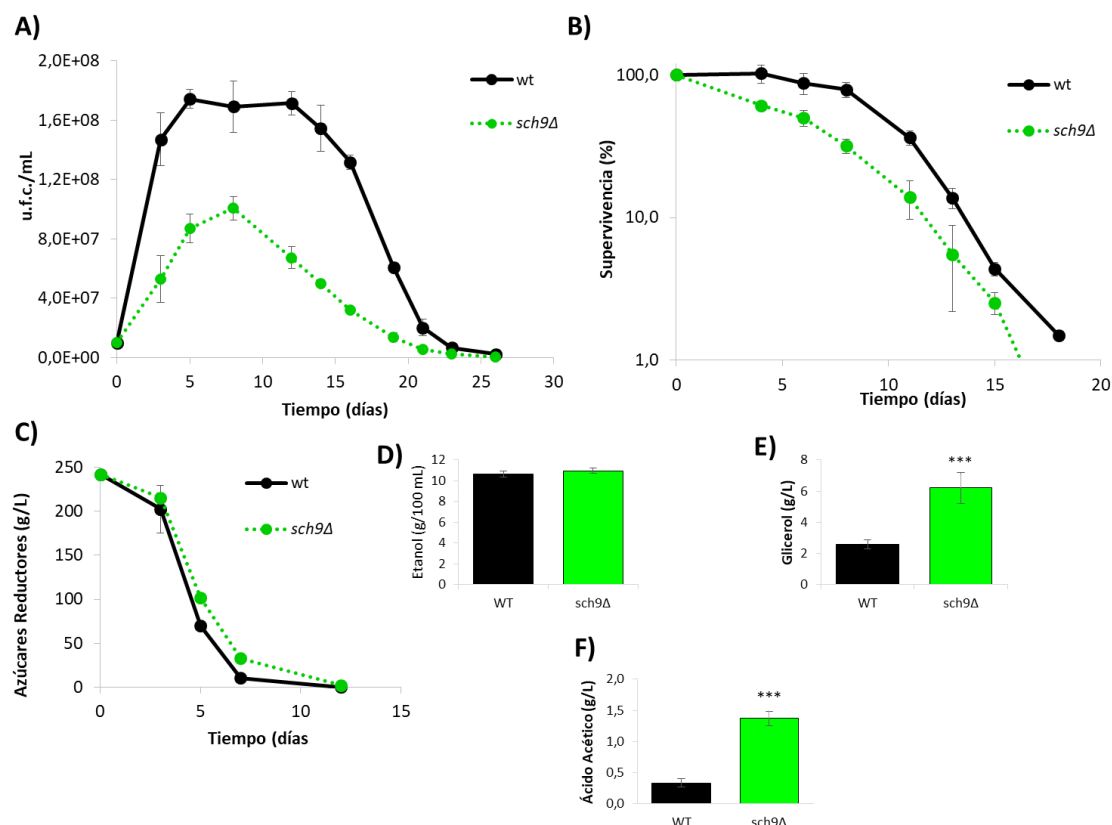
#### 1. Estudio de la ruta TOR a través de la proteína quinasa Sch9p en condiciones de vinificación

Las cepas vínicas se caracterizan por mantener una elevada capacidad fermentativa durante la vinificación y ser muy tolerantes a las condiciones de estrés tan fluctuantes presentes en el proceso de vinificación. Debido a la elevada concentración de azúcares presentes en el mosto, el estrés hiperosmótico inicial es contrarrestado con la producción de glicerol como osmolito compatible y, como consecuencia de la fermentación alcohólica, las elevadas concentraciones de etanol finales también son estresantes para la levadura. Además, uno de los aspectos nutricionales que es determinante durante las condiciones industriales, y que también induce una respuesta a estrés, es el ayuno de nitrógeno. Esta limitación de nitrógeno puede dar lugar a paradas en la fermentación o fermentaciones excesivamente lentas aunque haya azúcares fermentables disponibles.

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 6.2.1), la ruta más relevante en ese aspecto es la ruta TOR, donde Sch9p es una de las quinasas principales que actúan por debajo del complejo TORC1. Dicha ruta promueve el crecimiento y la biosíntesis de proteínas al mismo tiempo que bloquea el catabolismo de las fuentes de nitrógeno pobres. En condiciones de crecimiento de laboratorio, la proteína quinasa Sch9p está principalmente implicada en la biogénesis de ribosomas y la traducción, y se ha descrito que un mutante *sch9Δ* presenta una mayor longevidad cronológica (LC) y una mayor producción de glicerol (Fabrizio, 2001; Wei et al., 2009).

### 1.1. Estudio transcriptómico del impacto de la delección de *SCH9* durante la vinificación.

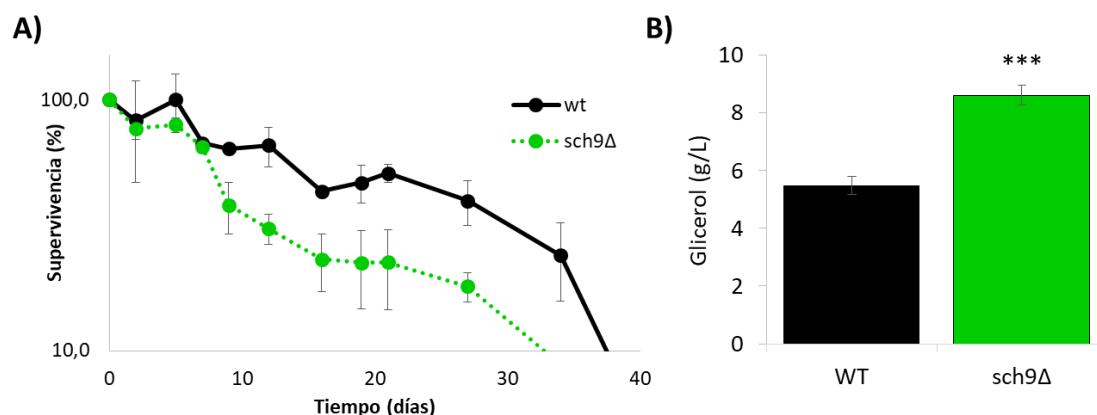
Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que la longevidad de un mutante *sch9Δ* dependía de la composición del medio en el que estaba creciendo (Picazo et al., 2015). En condiciones de fuente de carbono limitante, dicha delección extendía la longevidad cronológica, pero el efecto era contrario en condiciones de limitación de fuente de nitrógeno. Con estos datos de partida se planteó la caracterización del fenotipo causado por la mutación del gen *SCH9* con el fin de comprender su función en condiciones industriales. Al delecionar el gen *SCH9* de la cepa vínica haploide C9 se observa un menor crecimiento a lo largo de la fermentación en mosto natural variedad Tempranillo y su máximo de crecimiento (100 % viabilidad) se ve desplazado a tiempo 8 días respecto a los 6 de la cepa silvestre (Figura 75 panel A). Las curvas de longevidad cronológica (panel B) muestran que dicho mutante de delección presenta una menor LC, tal y como está descrito en Picazo et al., (2015). El consumo de azúcares también se ve retrasado pero la cepa mutante es capaz de finalizar la fermentación (Figura 75, panel C). Los principales metabolitos de interés enológico que se midieron al finalizar la fermentación son el etanol (panel D), el glicerol (panel E) y ácido acético (panel F) (Figura 75). La concentración de etanol (panel D) es muy similar a la de la cepa silvestre indicando que, a pesar de presentar un número menor de células viables, su capacidad fermentativa es elevada. Uno de los aspectos a destacar es la elevada concentración de glicerol (panel E), también descrita en medios de laboratorio (Fabrizio, 2001), a lo que se atribuye el aumento de la LC observada en dichos medios (Wei et al., 2009). Sin embargo, en estas condiciones no concuerda el aumento de los niveles de glicerol con la menor LC observada para el mutante *sch9Δ*, lo que indica que en condiciones de vinificación el glicerol por sí mismo no es capaz de extender la longevidad. Un aumento de la producción de glicerol como el observado (2.4 veces mayor) en el mutante *sch9Δ* es de gran interés en la industria vínica por su contribución positiva a las características organolépticas del vino. Sin embargo, la delección del gen *SCH9* también conlleva un aumento en los niveles de ácido acético (panel F), otro subproducto de la fermentación alcohólica y considerado, en este caso, negativo para la calidad del vino. El aumento de la producción de ácido acético se ha asociado con una menor LC (Longo y Fabrizio, 2012), de manera que éste podría ser un metabolito más relevante respecto de la longevidad durante la fermentación vínica. Se ha descrito en la bibliografía que las modificaciones genéticas que conducen a un aumento de los niveles de glicerol suelen asociarse con un aumento paralelo de los niveles de ácido acético (Remize et al., 1999). Así pues, Sch9p parece estar en el centro de la producción coordinada de ambos metabolitos, lo que hace interesante conocer los genes implicados en la LC dependientes de la proteína quinasa Sch9p en condiciones de vinificación.



**Figura 75.** Impacto de la delección de la proteína quinasa Sch9p en vinificación en mosto natural variedad Tempranillo. Curvas de crecimiento del mutante *sch9Δ* en la cepa vínica C9. Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del apartado anterior. Se tomó el valor a tiempo 5 días como el 100 % de células viables (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Etanol (g/100 mL) (D), glicerol (g/L) (E) y ácido acético (g/L) (F) determinados al finalizar la fermentación vínica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ).

A continuación, se realizó un estudio transcriptómico mediante micromatrices de DNA con muestras de RNA procedentes de la fermentación alcohólica de MS75 a tiempo 5 días de fermentación. La mayor parte de los estudios globales, transcriptómicos y proteómicos, se han realizado en mosto sintético porque resulta más reproducible y facilita la comparación de resultados, además de mejorar la eficiencia de las extracciones de RNA y de proteínas (Rossignol et al., 2003, 2009; Zuzuarregui et al., 2006). La composición del mosto sintético estándar MS300 es rica en nitrógeno (300 mg/L, de ahí su nombre), la selección de una cantidad reducida en MS75 se basó en que la limitación de nitrógeno debería revelar el impacto de la delección del gen *SCH9* respecto de la cepa silvestre. A los 5 días de fermentación se ha alcanzado la fase estacionaria, lo que evita interferencias producidas por células que todavía pueden estar dividiéndose en etapas más tempranas, pero manteniéndose las células metabólicamente activas. En la Figura 76 se estudia la posible diferencia que supone sobre la LC el cambio de mosto natural a MS75, cuya concentración de nitrógeno también es deficiente. En este medio persisten los fenotipos relevantes de la mutación, la reducción de la LC en el mutante *sch9Δ* se agudiza en MS75 (panel A), ya observándose la reducción en la LC

previamente en mosto natural (Figura 76, panel B), y se mantienen los niveles de glicerol elevados, 1.6 veces mayor en *sch9Δ* respecto de la cepa silvestre (panel B).



**Figura 76.** Impacto de la delección del gen *SCH9* en condiciones de vinificación en mosto sintético MS75. Curvas de longevidad cronológica obtenidas a partir de las u.f.c./mL a lo largo de la fermentación a diferentes tiempos (A). Producción de glicerol (g/L) (B) al final de la fermentación. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y el mutante *sch9Δ* (\*\*\*) P-valor  $\leq 0.005$ ).

Los resultados del análisis transcriptómico en las condiciones descritas permitieron la detección de la expresión de 5841 genes, de los cuales los niveles de mRNA correspondientes a 1077 genes se encontraron aumentados 3 veces en el mutante respecto de la cepa silvestre mientras que los correspondientes a 1006 genes se encontraron disminuidos en el mutante *sch9Δ*, también en la misma proporción. Como puede deducirse de los resultados, la transcripción en el mutante *sch9Δ* se ve ampliamente afectada en condiciones de vinificación puesto que los niveles de mRNA del 35.6 % de los genes varían. En la Tabla 10 se muestran las categorías de *Gene Ontology* (GO) sobrerrepresentadas en los resultados del análisis comparando el mutante *sch9Δ* con la cepa silvestre. La obtención de las categorías de GO se ha realizado utilizando el programa FuncAssociate 2.1 (Berriz et al., 2009). En la figura suplementaria 2 de Vallejo et al., (2017a) se muestran todos los genes cuyos niveles de mRNA se ven aumentados o disminuidos como resultado de la delección del gen *SCH9* mediante el análisis transcriptómico junto con sus p-valores mientras que en la Tabla 10 se muestran los genes correspondientes a las categorías de *Gene Ontology* (GO) sobrerrepresentadas y en la Tabla 11 los genes seleccionados en base a los análisis transcriptómicos. De entre las categorías de GO correspondientes a genes con mayor expresión en la cepa mutante cabe destacar procesos relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, en concreto, leucina, arginina, isoleucina, triptófano y lisina, rutas que coinciden parcialmente con las inducidas por el factor transcripcional Gcn4p (Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012), lo que permite establecer una posible conexión entre la ruta TOR/Sch9p y el GAAC. También los genes implicados en la síntesis de ácidos carboxílicos presentan mayor expresión, entre los cuales cabe destacar al gen *SNO1*, que contribuye a la actividad glutaminasa liberando amonio, y el gen *IDP1*, que cataliza la oxidación de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato pudiéndose utilizar posteriormente en la síntesis de compuestos nitrogenados. Las categorías de síntesis de ergosterol y quitina también se encuentran sobrerrepresentadas en el mutante *sch9Δ*. La inducción de la síntesis de ergosterol, compuesto principal de la membrana celular (Parks y Casey, 1995), puede provocar cambios en la integridad y la fluidez de la membrana que afecten a la longevidad del mutante.

Lo mismo se puede decir de la inducción de genes relacionados con la síntesis de quitina respecto a la pared celular. La mayor expresión de genes relacionados con la síntesis de quitina no concuerda con una mayor acumulación de dicho compuesto, tal y como se observa en la Figura 77. La tinción con Calcofluor White (CFW) (Pringle, 1991) no muestra una mayor acumulación en el mutante *sch9Δ* respecto de la cepa silvestre en los tres tiempos observados, indicando que no existe una correlación directa entre la transcripción y la traducción de genes de proteínas de la biosíntesis de quitina. Existen genes implicados en la categoría edición de los aminoacil-tRNA (*ILS1*, *CDC60*, *NAM2*, *ISM1*, *VAS1*) (Tabla 10) que también presentan mayor expresión, aunque no tan significativamente como otras categorías funcionales como la biosíntesis de aminoácidos celulares, lo que concuerda con la conocida implicación de Sch9p en la síntesis proteica.

**Tabla 10.** Categorías de *Gene Ontology* (GO) representadas en los perfiles de expresión del mutante *sch9Δ* respecto de la cepa silvestre (C9) mediante el programa FuncAssociate 2.1. Las categorías se ordenan por el p-valor. LOD: logaritmo de la proporción de probabilidades.

#### INDUCIDOS

Categoría GO	P-valor	LOD	Genes
BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS CELULARES	2.419E-30	1.024	<i>LEU2</i> , <i>ARG4</i> , <i>ILV5</i> , <i>STR2</i> , <i>ASN2</i> , <i>ARG7</i> , <i>IDP1</i> , <i>TRP4</i> , <i>LYS1</i> , <i>ILV3</i>
BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	9.014E-28	0.895	<i>LEU2</i> , <i>ARG4</i> , <i>ILV5</i> , <i>SNO1</i> , <i>STR2</i> , <i>ASN2</i> , <i>ARG7</i> , <i>IDP1</i> , <i>TRP4</i> , <i>LYS1</i> , <i>ILV3</i>
BIOSÍNTESIS DE ERGOSTEROL	2.406E-10	1.178	<i>ERG7</i> , <i>ERG27</i> , <i>ERG2</i> , <i>ERG25</i> , <i>ERG6</i> , <i>ERG8</i> , <i>ERG20</i> , <i>ERG13</i> , <i>ERG9</i> , <i>ERG28</i>
TRADUCCIÓN CITOPLASMÁTICA	3.471E-09	0.449	<i>RPS1</i> , <i>TMA7</i> , <i>RPS25B</i> , <i>RPL6B</i> , <i>RPP0</i> , <i>RPL38</i> , <i>TAE1</i> , <i>RPS0B</i> , <i>THS1</i> , <i>RPL31B</i>
ACTIVIDAD DE EDICIÓN DE AMINOACIL-tRNAs	1.005E-07	1.923	<i>ILS1</i> , <i>CDC60</i> , <i>NAM2</i> , <i>ISM1</i> , <i>VAS1</i>
METABOLISMO DE LA QUITINA DE LA PARED CELULAR	1.604E-06	1.100	<i>CHS1</i> , <i>CHS5</i> , <i>CTS1</i> , <i>BUD7</i> , <i>GFA1</i> , <i>BCH2</i> , <i>CHS2</i> , <i>CHS3</i> , <i>BCH1</i> , <i>UTR2</i>

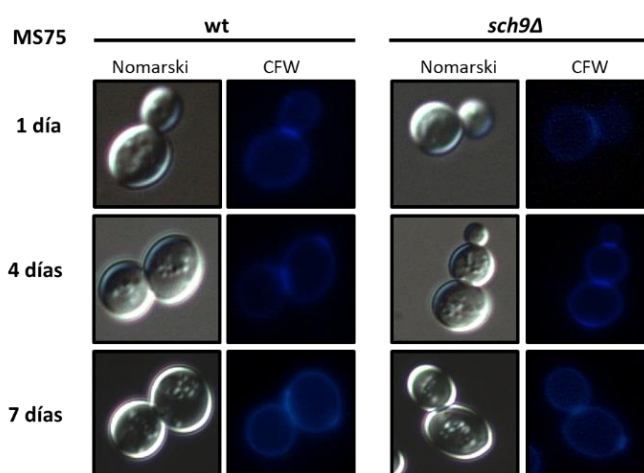
#### REPRIMIDOS

Categoría GO	P-valor	LOD	Genes
PEROXISOMAS	1.405E-07	0.807	<i>PEX18</i> , <i>PEX10</i> , <i>CTA1</i> , <i>PEX19</i> , <i>GPX1</i> , <i>PEX26</i> , <i>POT1</i> , <i>SPS19</i> , <i>POX1</i> , <i>MSP1</i>
GENES TRANSCRITOS POR LA RNA POLIMERASA II INDUCIBLES POR ESTRÉS	2.710E-07	0.459	<i>NRG1</i> , <i>SPP41</i> , <i>SDS3</i> , <i>CRF1</i> , <i>OPI1</i> , <i>MIG3</i> , <i>DAT1</i> , <i>IZH2</i> , <i>MED8</i> , <i>YAP5</i>
ACTIVIDAD OXIDOREDUCTASA	1.911E-06	0.383	<i>AAD10</i> , <i>YKL070W</i> , <i>YDL114W</i> , <i>CTA1</i> , <i>YDR541C</i> , <i>YJR149W</i> , <i>GPX1</i> , <i>TSC10</i> , <i>YKL071W</i> , <i>YJR096W</i>

Los peroxisomas, los genes transcritos por la RNA polimerasa II inducibles por estrés y la actividad oxidoreductasa son categorías de GO dentro de las cuales se encuentran genes cuyos niveles de mRNA son menores como consecuencia de la delección de *SCH9*. Un mutante deficiente en *SCH9* presenta la ruta TOR/Sch9p parcialmente inhibida por lo que la transcripción se reduce dando lugar a un menor crecimiento (Figura 75). En el mutante *sch9Δ* los genes relacionados con la actividad oxidoreductasa están reprimidos, dentro de los cuales cabe destacar el gen *CTA1* que codifica una catalasa implicada en la ruptura del peróxido de hidrógeno y el gen *GPX1*, codificante de una glutatión peroxidasa implicada en la reutilización del glutatión para evitar la oxidación de proteínas. Estos resultados indican que la respuesta al

estrés oxidativo mediante la detoxificación de las ROS (*Reactive Oxygen Species*) se encuentra disminuida. Por otro lado, genes como *GRX4* y *GRX7* se encuentran inducidos 9.58 y 7.2 veces, respectivamente. Estos genes codifican glutarredoxinas implicadas en la protección frente al estrés oxidativo. Por lo tanto, parece que hay un desequilibrio redox en el mutante *sch9Δ*. La expresión reducida de genes relacionados con los peroxisomas sugiere una posible conexión entre dichos orgánulos y la longevidad.

El fenotipo característico del mutante *sch9Δ*, aparte de presentar una menor LC en condiciones de vinificación (Figura 75 y Figura 76), es la acumulación tanto de glicerol como de ácido acético. Los análisis transcriptómicos no muestran una inducción de los principales genes implicados en la síntesis de glicerol (*GPD1/2*, *GPP1/2*) o en su transporte (*FPS1*, *STL1*). Tampoco se observan genes inducidos implicados en la síntesis de ácido acético; sin embargo, la expresión del gen *ALD6*, principal enzima citosólica implicada en la síntesis de ácido acético (Remize et al., 2000), y del gen *ACS1*, acetil-CoA sintetasa, se encuentran reducidas 4.76 y 6.13 veces, respectivamente. Se ha descrito que, en vinificación, Ald6p es degradada vía autofagia en condiciones de ayuno de nitrógeno (Onodera y Ohsumi, 2004; Orozco et al., 2012c) lo que podría explicar los niveles reducidos de mRNA correspondiente a Ald6p en nuestras condiciones.



**Figura 77.** Visualización de la localización de la quitina a lo largo de la fermentación en mosto sintético MS75 a diversos tiempos en la cepa silvestre C9 y en el mutante *sch9Δ*. CFW: CalcoFluor White.

## 1.2. Análisis del efecto de la delección de genes de potencial interés inducidos o reprimidos durante la fermentación en el mutante *sch9Δ*

Una vez identificados los niveles de mRNA y, como consecuencia, los genes pertinentes, en el mutante *sch9Δ* junto con las categorías de GO correspondientes, se seleccionaron ciertos genes de interés (Tabla 11) para estudiar el efecto de su delección en el crecimiento, el consumo de azúcares reductores y la producción de metabolitos de interés enológico. El gen *AZR1* se seleccionó ya que, después del gen *LEU* y el gen *YAL064W*, fue el gen cuya expresión aumentó más en el mutante *sch9Δ*. *AQY2* se seleccionó ya que sus niveles de mRNA estaban aumentados mientras que *GUT2* y *AQY1* por estar disminuidos, Tabla 11. En *S. cerevisiae* hay cuatro acuaporinas divididas en Aqy1p y Aqy2p, las cuales transportan únicamente agua (acuaporinas ortodoxas), y Fps1p y Aqy3p, que pueden transportar también glicerol (aquagliceroporinas). Las acuaporinas Aqy1p y Aqy2p dependen de la proteína Sch9p pero no

los transportadores de glicerol Fps1p y Stl1p (datos transcriptómicos). La expresión de los genes que codifican las dos acuaporinas principales de *S. cerevisiae*, *AQY1* y *AQY2*, reprimida 10.7 veces e inducida 6.7 veces (Tabla 11), respectivamente, es aparentemente contradictoria, aunque se ha postulado que Aqy1p y Aqy2p tienen funciones diferentes a pesar de que su secuencia coincide en un 88 % (Sidoux-Walter et al., 2004). Backhus et al., (2001) demostraron que la expresión de *AQY1* aumentaba en ayuno de nitrógeno en comparación con otras condiciones lo que podría indicar una regulación transcripcional propia que explicaría la aparente contradicción en la expresión de las acuaporinas. El gen *GUT2*, cuyos niveles de mRNA se encuentran reducidos, codifica una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial implicada en la degradación del glicerol. Además, también se añadieron al estudio los genes *ADR1* y *PEX12*, cuyos niveles de mRNA no variaron en el análisis transcriptómico por la delección de *SCH9*. El gen *ADR1* es un factor transcripcional de genes de proteínas peroxisomales (categoría de GO de genes cuyos niveles se reducen) mientras que *PEX12* codifica una ubiquitin ligasa esencial para la biogénesis de peroxisomas (Albertini et al., 2001) por lo que puede ampliar información de la relevancia de los peroxisomas en vinificación.

**Tabla 11.** Genes seleccionados a partir del análisis transcriptómico para análisis posteriores. En rojo y verde se muestran la acumulación o reducción del nivel de mRNA, respectivamente, en el mutante *sch9Δ* en comparación con la condición control (C9). La información de los genes es la proporcionada por *Saccharomyces Genome Database* (SGD). Los niveles de mRNA correspondientes a los genes *ADR1* y *PEX12* no se encontraron aumentados o disminuidos en el análisis transcriptómico.

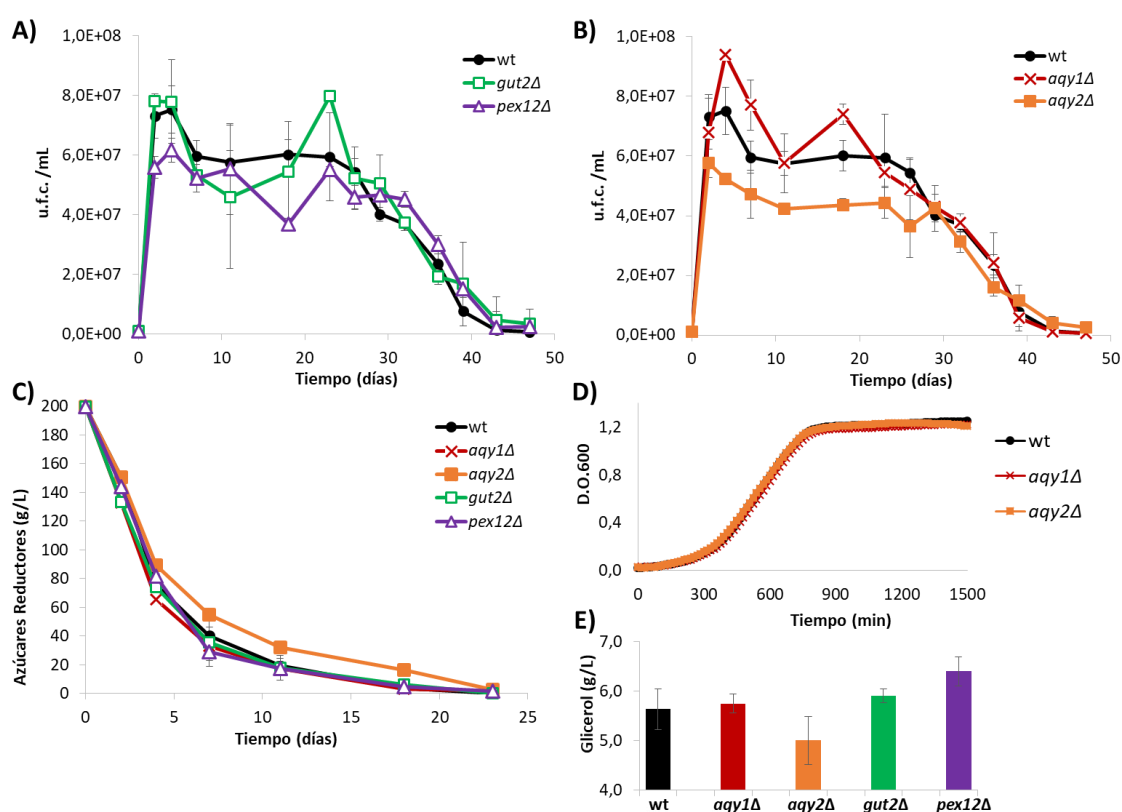
Nombre Estándar	Nombre Sistemático	Estadístico	p-valor	Descripción
<i>AZR1</i>	YGR224W	22.168	7.210E-09	Transportador de membrana plasmática implicado en la resistencia a azoles y ácido acético
<i>AQY2</i>	YLL052C	6.736	1.069E-04	Acuoprina que media el transporte de agua a través de las membranas celulares
<i>AQY1</i>	YPR192W	-10.778	2.827E-06	Acuoprina específica de esporas que media el transporte de agua a través de las membranas celulares
<i>GUT2</i>	YIL155C	-5.465	4.714E-04	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial
<i>ADR1</i>	YDR216W	—	—	Factor transcripcional de genes de proteínas peroxisomales y metabolismo del etanol, glicerol y ácidos grasos
<i>PEX12</i>	YMR026C	—	—	Peroxina y ubiquitinligasa requerida para la biogenesis de ribosomas y la importación de proteínas de la matriz peroxisomal

En la Figura 78 se muestran los resultados de crecimiento, consumo de azúcares reductores y la producción de glicerol obtenidos de la fermentación realizada en MS75 con los mutantes *gut2Δ*, *aqy1Δ* y *aqy2Δ*. Los mutantes *adr1Δ* y *azr1Δ* no presentaron fenotipos diferenciales respecto de la cepa silvestre en condiciones de vinificación (datos no mostrados). Se seleccionó el mosto MS75 en vez de MS300 o mosto natural con el objetivo de agudizar los fenotipos observados, tal y como se aprecia con el mutante *sch9Δ* (Figura 75 y Figura 76) y porque fue el medio donde se realizó el ensayo transcriptómico. En el panel B (Figura 78) se observa que únicamente el mutante *aqy2Δ* presenta un déficit de crecimiento (menos u.f.c./mL); dicho fenotipo no se observa en el mutante *aqy1Δ*. Como consecuencia de ese crecimiento reducido, su velocidad en el consumo de azúcares reductores es menor pero es capaz de finalizar la fermentación. Por tanto, la acuaporina Aqy2p estaría implicada en el crecimiento en condiciones de vinificación. El defecto de crecimiento es dependiente de medio



puesto que en YPD el fenotipo es igual a la cepa silvestre y al mutante *aqy1Δ* (panel D), indicando que *aqy2Δ* carece de una correcta adaptación a las condiciones de fermentación. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Karpel y Bisson (2006) donde la delección del gen *AQY1* en el fondo genético UCD 935 no afecta a la capacidad fermentativa en condiciones de vinificación.

La delección de *GUT2* no tiene ningún efecto ni en el crecimiento (panel A) ni el consumo de azúcares (panel C) o en la producción de glicerol (panel E). Por lo tanto, no puede explicar el aumento en la concentración de glicerol en el mutante *sch9Δ*. La delección del gen *PEX12* no tiene ningún fenotipo significativo en el crecimiento (panel A), el consumo de azúcares (panel C) o la producción de glicerol (panel E), indicando que los peroxisomas no son esenciales para la fermentación alcohólica del mosto; sin embargo, es el que produce niveles mayores de glicerol, por lo que no puede descartarse que, en condiciones específicas, tenga un papel relevante en el proceso.



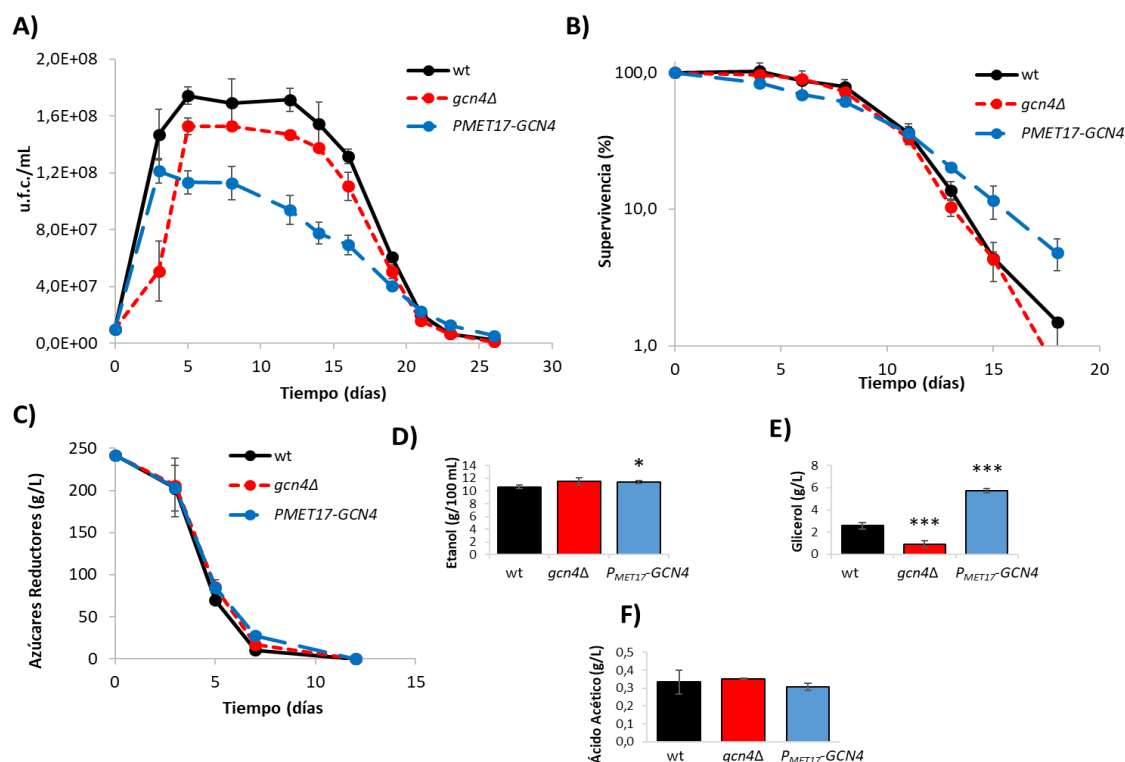
**Figura 78.** Comportamiento fermentativo en mosto sintético MS75 de mutantes de delección en la cepa vínica C9 en genes cuya expresión se ve afectada en el mutante *sch9Δ*. Curvas de crecimiento de los mutantes *gut2Δ*, *pex12Δ*, *aqy1Δ*, *aqy2Δ* y la cepa silvestre (A) y (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Curva de crecimiento en YPD de los mutantes *aqy1Δ* y *aqy2Δ* (D). Glicerol (g/L) determinado al finalizar la fermentación vínica (E). Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 1.3. Implicación de Gcn4p en la longevidad cronológica y en la producción de glicerol en condiciones de vinificación

La categoría de GO más sobrerrepresentada en los análisis transcriptómicos del mutante *sch9Δ* es la relacionada con la síntesis de aminoácidos. Los genes que se incluyen en esta categoría se encuentran inducidos por el activador transcripcional Gcn4p (Hinnebusch, 2005). Aunque en los resultados obtenidos del análisis transcriptómico en condiciones de vinificación los niveles de expresión del gen *GCN4* no varían, en condiciones de laboratorio sí que se ha demostrado una inducción de su traducción (Smets et al., 2008).

Se realizó tanto la delección de *GCN4* en la cepa silvestre C9 como su sobreexpresión mediante el reemplazamiento de su promotor por el promotor regulable *MET17* en la cepa C9. Se siguió su efecto en la longevidad, consumo de azúcares reductores y producción de metabolitos de interés en mosto natural (Figura 79) para poder así comparar con los datos obtenidos en la Figura 75, donde se analizó el fenotipo de *sch9Δ* también en mosto natural. La sobreexpresión de *GCN4* se realizó debido a la inducción de genes de biosíntesis de aminoácidos y a una mayor producción de glicerol en el mutante *sch9Δ*. El promotor *MET17* suprime la regulación a nivel traduccional de *GCN4*, pasando a ser su expresión dependiente de la presencia de aminoácidos azufrados. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la sobreexpresión de genes relacionados con la longevidad mediante el promotor *MET17* constituye una herramienta muy eficaz para modificar la longevidad y la producción de metabolitos en condiciones de vinificación (Orozco et al., 2013).

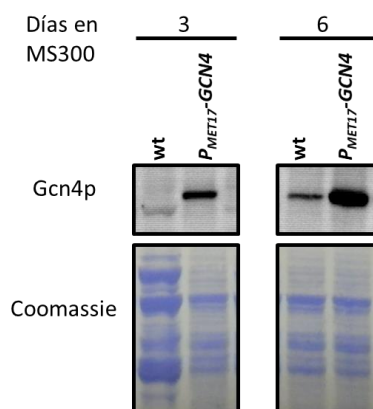
La delección de *GCN4* no tiene ningún impacto en la LC (Figura 79 panel B) o en el consumo de azúcares reductores (panel C) pero el mutante sí muestra un ligero déficit en el crecimiento (panel A). Aunque el mosto presenta la mayor parte de aminoácidos necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae* parece que la síntesis *de novo* de algunos son necesarios para conseguir un crecimiento óptimo. En cuanto a los metabolitos de interés enológico, *gcn4Δ* presenta una menor producción de glicerol (panel E) respecto de la cepa silvestre mientras que los niveles de etanol (panel D) y ácido acético (panel F) se mantienen similares a C9 lo que sugiere que el metabolismo de los aminoácidos no influye en la finalización de la fermentación alcohólica.



**Figura 79.** Papel del factor transcripcional Gcn4p en condiciones de vinificación en mosto natural variedad Tempranillo. Curvas de crecimiento de los mutantes indicados en la cepa vínica C9. Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación (A). Curva de longevidad cronológica obtenida a partir del apartado anterior. Se fijó el tiempo 5 como el 100 % de células viables (B). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (C). Etanol (g/100 mL) (D), glicerol (g/L) (E) y ácido acético (g/L) (F), determinados al finalizar la fermentación vínica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ).

La cepa que sobreexpresa *GCN4* presenta un déficit de crecimiento, Figura 79 panel A, siendo la reducción en dicho crecimiento muy similar a la observada en el mutante *sch9Δ*. La LC (panel B) es ligeramente mayor en dicho mutante indicando que la síntesis de aminoácidos puede ser de importancia cuando las células se encuentran en fase exponencial. El consumo de azúcares reductores se ve retrasado (panel C) y la concentración ácido acético (panel F) no varía; únicamente se observa mayor etanol (panel D) en la cepa que sobreexpresa *GCN4*. La sobreproducción de glicerol (panel E) en la cepa que sobreexpresa *GCN4* deja patente que la proteína quinasa Sch9p puede estar regulando la producción de glicerol a través del activador transcripcional Gcn4p. Con el objetivo de ahondar más en la relación entre Sch9p y Gcn4p se construyó el doble mutante de delección en la cepa C9 y se realizó una vinificación en mosto natural. El doble mutante presentaba tal déficit de crecimiento que no llegaba a implantarse en el mosto y, por tanto, todas las vinificaciones realizadas terminaban por contaminarse (datos no mostrados) por lo que no fue posible analizar su fenotipo en nuestras condiciones. El mutante *gcn4Δ* durante la fermentación en mosto natural presenta una reducción de glicerol, a diferencia del sobreexpresante, indicando que en estas condiciones el incremento en la concentración de glicerol podría estar causado por algunos de los genes activados por Gcn4p. La sobreexpresión de *GCN4* se comprobó mediante *western blot* a tiempo 3 y 6 días de

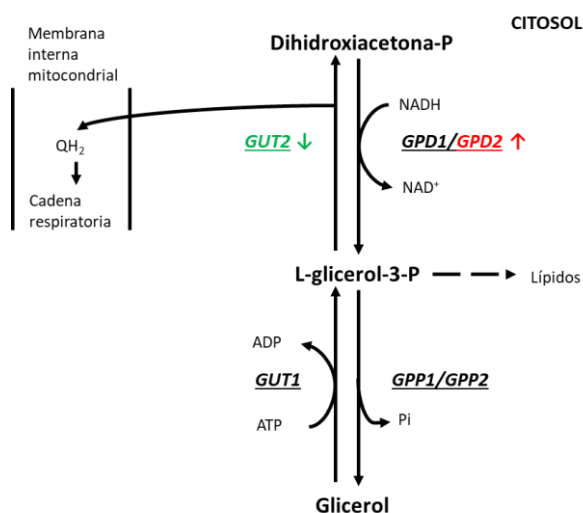
fermentación en mosto sintético MS300 (Figura 80), medio más similar al mosto natural donde se analizaron inicialmente los fenotipos del mutante *gcn4Δ* y la cepa sobreexpresante de *GCN4* (Figura 79) junto con el mutante *sch9Δ* (Figura 75).



**Figura 80.** Análisis de la sobreexpresión del gen *GCN4* mediante *western blot* en mosto sintético MS300. La tinción con Coomassie se utilizó con control de carga.

#### 1.4. Implicación de Sch9p en la producción de glicerol a través de la localización y expresión de Gpd1p

El glicerol es considerado un subproducto de la fermentación y, por tanto, está implicado en el metabolismo del carbono en *S. cerevisiae*. Bajo condiciones aerobias puede utilizarse como fuente de carbono y en cualquier circunstancia mantiene la ósmosis gracias a que actúa como osmolito compatible. Además, su precursor el glicerol-3-fosfato participa en la síntesis de glicerolípidos. Desde el punto de vista de la regulación metabólica, la biosíntesis del glicerol es, sin embargo, mucho más importante dado que su producción a partir de la dihidroxiacetona- P está acoplada a la reoxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, mecanismo que permite contribuir a la recuperación de coenzima oxidado y así mantener un flujo glicolítico elevado en condiciones de fermentación alcohólica (Larsson et al., 1998; Nevoigt y Stahl, 1997). Las reacciones implicadas en la síntesis de glicerol se muestran en la Figura 81. A destacar los genes *GPD1* y *GPD2* que codifican la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Mientras que *GPD1* se induce como consecuencia de una elevada osmolaridad o choque térmico, un mutante deficiente en *GPD2* no puede crecer en condiciones anaerobias (Ansell et al., 1997). Además, la localización de ambos difiere en función de las condiciones ambientales (Valadi et al., 2004).



**Figura 81.** Metabolismo del glicerol en *S. cerevisiae*. Se indican los genes implicados en la síntesis de glicerol. En rojo se muestran los genes cuyos niveles de mRNA se encuentran aumentados o reducidos procedentes del análisis transcriptómico del mutante *sch9Δ* respecto de la cepa silvestre. Adaptado de Nevoigt y Stahl, (1997).

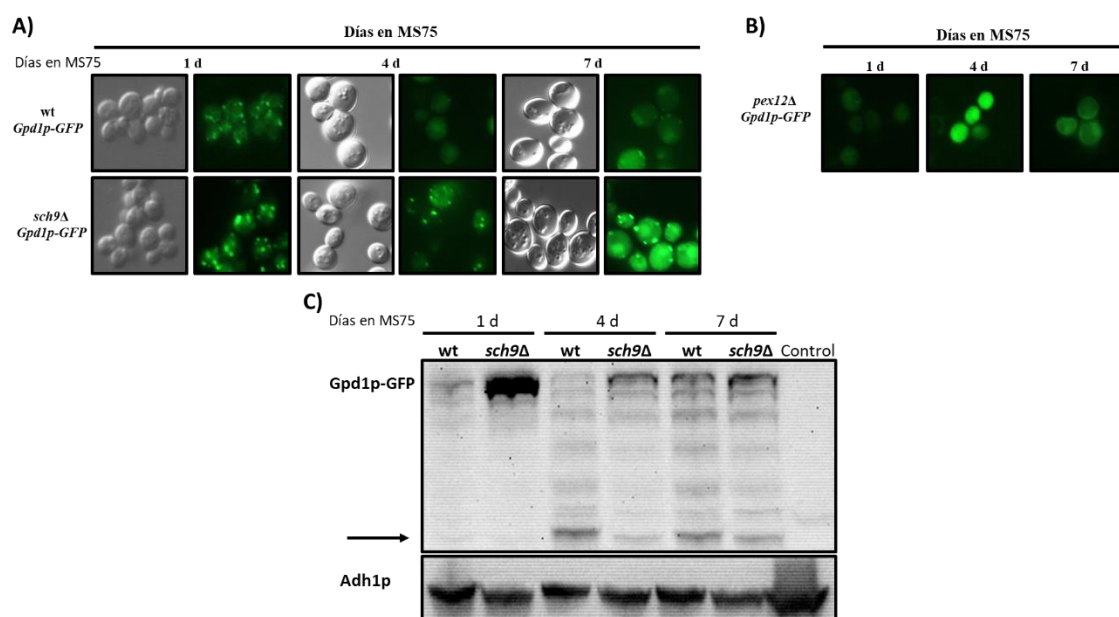
Los resultados transcriptómicos muestran unos niveles de expresión mayores de *GPD2* (3.9 veces mayor) en el mutante *sch9Δ* lo que podría explicar, en parte, su mayor concentración de glicerol. Sin embargo, Remize et al., (2003) demostraron que la formación de glicerol en condiciones de fermentación se debe principalmente a Gpd1p y no a Gpd2p, el cual no tiene ningún impacto en la fermentación alcohólica. Por otra parte, aunque el gen *GUT2* se encuentra reprimido en los análisis transcriptómicos (Tabla 11), se ha demostrado que su delección no tiene ningún efecto en la producción de glicerol durante la fermentación vínica (Figura 78). Los demás genes implicados en la síntesis o degradación de glicerol (*GPD1*, *GPP1*, *GPP2* y *GUT1*) no muestran cambios en sus niveles (datos transcriptómicos).

Los niveles de mRNA del gen *GPD2* junto con una reducción de los niveles del gen *GUT2*, genes implicados en la síntesis de glicerol, no bastan para explicar la mayor acumulación en el mutante *sch9Δ*. Una posible explicación es que la enzima Gpd1p, enzima principal encargada de la síntesis de glicerol en condiciones de vinificación, presente una regulación postranscripcional o una localización diferente que regule su actividad. Para corroborarlo, se siguió la localización de Gpd1p gracias a su etiquetado con la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) durante la vinificación en MS75 (Figura 82), medio donde se realizó el análisis transcriptómico. Trabajos previos en nuestro laboratorio también han estudiado la regulación de *GPD1* a nivel postranscripcional a través de las proteínas de unión a mRNA, como Pub1p (Orozco et al., 2016). Tal y como se observa, Gpd1p se localiza en acúmulos de la proteína de fusión a lo largo de la vinificación en las cepas analizadas. Sin embargo, el número de gránulos es mayor en el mutante *sch9Δ* que en la cepa silvestre y permanecen durante más tiempo.

Debido a la conexión obtenida en los análisis transcriptómicos donde se relaciona la proteína quinasa Sch9p con la formación de peroxisomas se analizó del mismo modo un mutante de delección en *PEX12*. De esta forma, se analizó si los acúmulos observados eran en realidad peroxisomas, dado que la localización de Gpd1p en peroxisomas bajo condiciones de estrés ya había sido propuesta anteriormente (Jung et al., 2010). Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, *PEX12* es necesario para la formación de peroxisomas por lo que un mutante deficiente no puede sintetizarlos. En el panel B de la Figura 82 se sigue detectando la

proteína de fusión Gpd1p-GFP pero no en acúmulos. Estos resultados sugieren que Gpd1p se encuentra en los peroxisomas en condiciones de vinificación.

Para evaluar si la localización de Gpd1p en los peroxisomas induce una mayor estabilidad de la proteína se analizaron los niveles de Gpd1p mediante *western blot* en las mismas condiciones (Figura 82 panel C) utilizando un anticuerpo frente a GFP. Los resultados muestran unos niveles mayores de Gpd1p en el mutante *sch9Δ* en los tres días analizados, aunque a tiempo 7 las diferencias no son tan claras. La presencia de bandas de menor tamaño a Gpd1p sugieren degradación de la proteína etiquetada. Lakhani et al., (2014) indicaron que la ruptura de la etiqueta GFP de la proteína Pot1p implica autofagia, en concreto degradación de peroxisomas, proceso conocido como pexofagia. La proteína GFP libre indicada con una flecha en el panel C podría indicar una menor autofagia en el mutante *sch9Δ* que en la cepa silvestre. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) inhibe la pexofagia a través de Sch9p (Lakhani et al., 2014) por lo que en condiciones de vinificación Sch9p puede promover la degradación de peroxisomas afectando así a la cantidad de proteína Gpd1p y, como consecuencia, su concentración. Sea cual sea el mecanismo de regulación de los niveles de Gpd1p, el hecho de que el mutante *sch9Δ* presente niveles elevados, aunque sea transitoriamente, es posiblemente la causa de la mayor producción de glicerol del mutante.

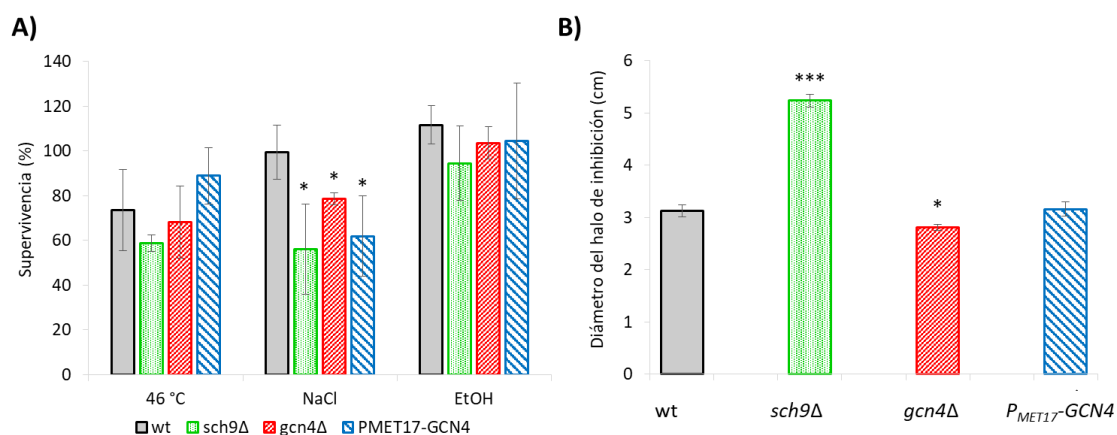


**Figura 82.** Visualización de la proteína Gpd1p, tanto su localización como sus niveles, a través de la construcción Gpd1p-GFP en condiciones de vinificación en MS75. Análisis de la proteína Gpd1p fusionada a GFP mediante microscopía de fluorescencia del mutante *sch9Δ* y la cepa silvestre a tiempo 1, 4 y 7 días de fermentación en mosto sintético MS75 (**A**). Mismo análisis para el mutante *pex12Δ* (**B**). Cuantificación de Gpd1p mediante *western blot* con un anticuerpo anti-GFP en los extractos proteicos procedentes de las cepas analizadas en el panel A (**C**). Se utilizó como control una cepa silvestre sin etiquetar y la alcohol deshidrogenasa (Adh1p).

### 1.5. Efecto de la delección de *SCH9* en la respuesta a estrés

Al presentar el mutante *sch9Δ* una mayor concentración de glicerol, tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de vinificación, se procedió a determinar si dicha mutación proporcionaba una mayor resistencia a los estreses típicos de la fermentación en fase estacionaria. Se analizaron los estreses de células en cultivo estacionario en YPD a estrés térmico (46 °C), estrés salino (1 M NaCl), estrés por etanol (10 %) y estrés oxidativo en presencia de peróxido de hidrógeno (30 % v/v) mediante inhibición en placa. Los resultados se muestran en la Figura 83.

No se observan diferencias respecto al estrés térmico y al estrés por etanol (panel A). El mutante *sch9Δ* es más sensible al estrés salino indicando que la proteína quinasa Sch9p está implicada en la adaptación frente a NaCl, tal y como está descrito en cepas de laboratorio (Pascual-Ahuir y Proft, 2007a,b). Respecto al estrés oxidativo (panel B), *sch9Δ* es el mutante que presenta más sensibilidad, resultados que no concuerdan con los obtenidos en cepas de laboratorio (Fabrizio, 2001; Huang et al., 2012) donde la delección de *SCH9* confiere una mayor resistencia al peróxido de hidrógeno. Mascarenhas et al., (2008) mostraron que el estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno causa una inducción transcripcional del gen *GCN4* y que, por tanto, un mutante deficiente en dicho gen es más sensible a dicho estrés, tal y como se muestra en nuestras condiciones. La sobreexpresión del gen *GCN4* no presenta fenotipo diferente para la tolerancia al estrés oxidativo y, al igual que su delección, es más sensible al estrés osmótico. De modo que la implicación de Gcn4p en la resistencia al estrés depende de la naturaleza del estrés aplicado y no parece correlacionar con la producción de glicerol mientras que la proteína quinasa Sch9p parece estar implicada en la respuesta a estrés en fase estacionaria.



**Figura 83.** Efecto de los estreses típicos de la fermentación en fase estacionaria en el crecimiento de los mutantes *sch9Δ*, *gcn4Δ* y la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4* junto con la cepa silvestre C9 (wt). Supervivencia después de la incubación de los mutantes indicados en YPD a 46 °C, 1 M NaCl y 10 % Etanol (A). El número de viables se midió mediante crecimiento en placa de YPD antes y después de la aplicación del estrés. Inhibición del crecimiento mediante la cuantificación del halo de inhibición de células en fase estacionaria en presencia de peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) (B). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\* P-valor ≤ 0.05; \*\* P-valor ≤ 0.01; \*\*\* P-valor ≤ 0.005).

### 1.6. Efecto diferencial de Sch9p y Gcn4p en el metaboloma en condiciones de vinificación

La proteína quinasa Sch9p está implicada en la LC, en la producción de metabolitos de interés enológico, sobre todo glicerol, y como ya se ha comentado anteriormente, su delección implica una remodelación de la expresión génica, siendo de importancia, el aumento de los niveles de la proteína Gpd1p. Para obtener una visión global de la función de *SCH9* se procedió a realizar un análisis metabolómico del mutante de delección en dicha proteína quinasa a partir de muestras procedentes de vinificación en MS300 a tiempo 5 días de fermentación. En este caso, y a diferencia del análisis transcriptómico, el mosto sintético utilizado fue MS300 y no MS75, condiciones más estándar de vinificación que pueden ser comparadas con trabajos anteriores. Además, vista la relación entre *SCH9* y el activador transcripcional *GCN4*, también se añadió al estudio el mutante sobreexpresante de *GCN4*, que también presenta un aumento del glicerol.

Un resumen de las diferencias encontradas en las cepas analizadas se muestra en la Tabla 12. De los 423 metabolitos analizados, 243 presentan niveles diferentes en el mutante *sch9Δ* respecto de la cepa silvestre. De esos 243, 70 se encontraron en mayor concentración y 173 en menor concentración con un p-valor menor de 0.05. Respecto al sobreexpresante de *GCN4*, los metabolitos cuyos niveles difieren respecto de la cepa silvestre son 256, ligeramente superior a los de *sch9Δ*. De esos 256, 147 se encuentran en mayor concentración y 109 en menor concentración. Al comparar *sch9Δ* con *P<sub>MET17</sub>-GCN4*, únicamente se encuentran 50 metabolitos en mayor concentración en el mutante *sch9Δ* mientras que 146 se encuentran en menor concentración. Mientras la sobreexpresión de *GCN4* causa más cambios por aumento de acumulación de metabolitos que por disminución (**147** | **109**), la delección de *SCH9* causa más cambios de disminución de acumulación que de aumento (**70** | **173**). Los datos globales y totales del metaboloma realizado se pueden encontrar en el material suplementario de Vallejo et al., (2017a) mientras que en la Tabla 13 se muestran los principales metabolitos cuyos niveles intracelulares varían y se comentan a lo largo de este apartado.

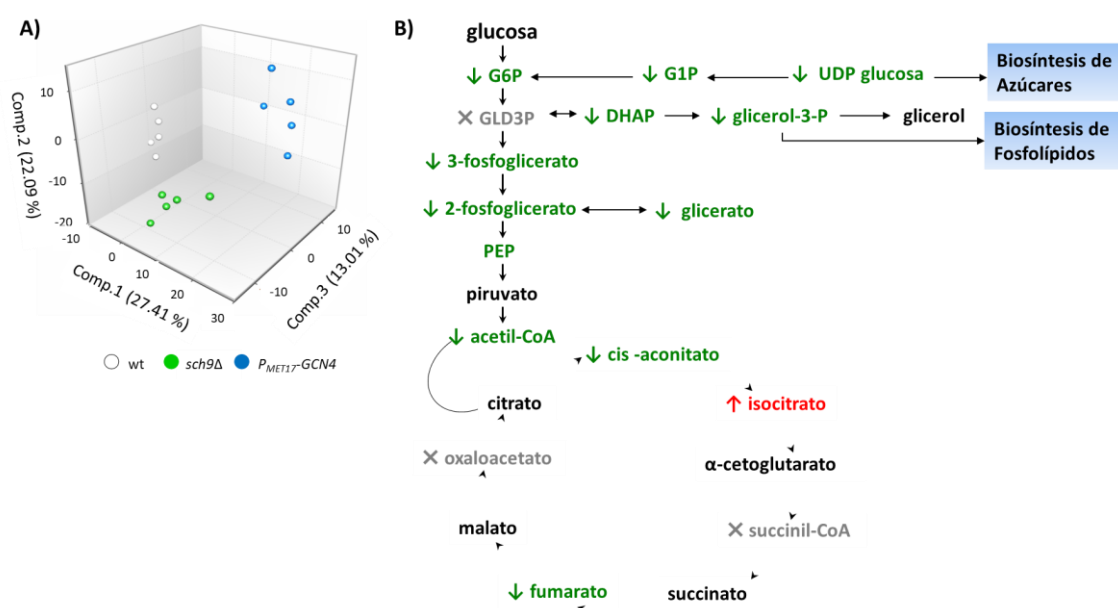
**Tabla 12.** Comparación de los números de metabolitos cuyos niveles varían procedente del análisis metabolómico en *sch9Δ* y *P<sub>MET17</sub>-GCN4* y la respectiva cepa silvestre (C9). Los resultados se analizaron mediante el test estadístico de Welch. En rojo y verde se muestra el número de metabolitos cuya concentración aumenta o disminuye, respectivamente, en relación a la cepa de referencia.

Comparación Estadística			
Prueba t de dos muestras de Welch	<u>P<sub>MET17</sub>-GCN4</u>	<u>sch9Δ</u>	<u>sch9Δ</u>
	WT	WT	P <sub>MET17</sub> -GCN4
Metabolitos totales <i>p</i> ≤0.05	256	243	196
Metabolitos (↑↓)	<b>147</b>   <b>109</b>	<b>70</b>   <b>173</b>	<b>50</b>   <b>146</b>
Metabolitos totales 0.05< <i>p</i> <0.10	32	38	28
Metabolitos (↑↓)	<b>21</b>   <b>11</b>	<b>16</b>   <b>22</b>	<b>11</b>   <b>17</b>



En el panel A de la Figura 84 se muestra un análisis de componentes principales (PCA) donde se observan los perfiles de la cepa silvestre C9, el mutante *sch9Δ* y el mutante que sobreexpresa el gen *GCN4*, incluidas las réplicas. Cada grupo analizado presenta un perfil diferente conformado por las cinco réplicas analizadas. Queda patente que ambas modificaciones genéticas tienen un impacto global diferente en el metaboloma, aunque coincidan en la sobreproducción de glicerol. Respecto a ambas manipulaciones genéticas, la mayor parte de metabolitos asociados con el metabolismo energético, en concreto, la glicólisis, TCA y la ruta de las pentosas, se encuentran en baja concentración respecto de la cepa control, a excepción del isocitrato, Figura 84 panel B.

Respecto a la delección del gen *SCH9*, los aminoácidos proteínogénicos (a excepción de glutamato, lisina y aspartato) también se encuentran en menor proporción en el mutante *sch9Δ* con respecto a la cepa silvestre (Tabla 13), lo que puede causar un aumento de la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos como mecanismo compensatorio (Tabla 10). La acumulación de solutos compatibles como aminoácidos, azúcares o polialcoholes junto con derivados de aminas cuaternarias como la betaína, colina y trigonelina, indicadores de estrés osmótico, se encuentran o bien reducidos o no presentan cambios (Tabla 13) indicando que no hay indicios de estrés osmótico en el mutante *sch9Δ*. Esto podría explicar la menor supervivencia a estrés salino observada en el panel A de la Figura 83.



**Figura 84.** Influencia de la delección del gen *SCH9* y la sobreexpresión de *GCN4* en el metabolismo en estado estacionario durante vinificación en mosto sintético MS300. Análisis de los componentes principales (PCA) de las cepas analizadas en los análisis metabolómicos (A). Metabolitos cuyos niveles varían en *sch9Δ* y *P<sub>MET17</sub>-GCN4* implicados en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílico (TCA) (B). En rojo y verde se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia respectivamente en comparación con la cepa silvestre con un estadístico de  $p \leq 0.05$ . En negro, los metabolitos cuyos niveles no varían y en gris, los no detectados.

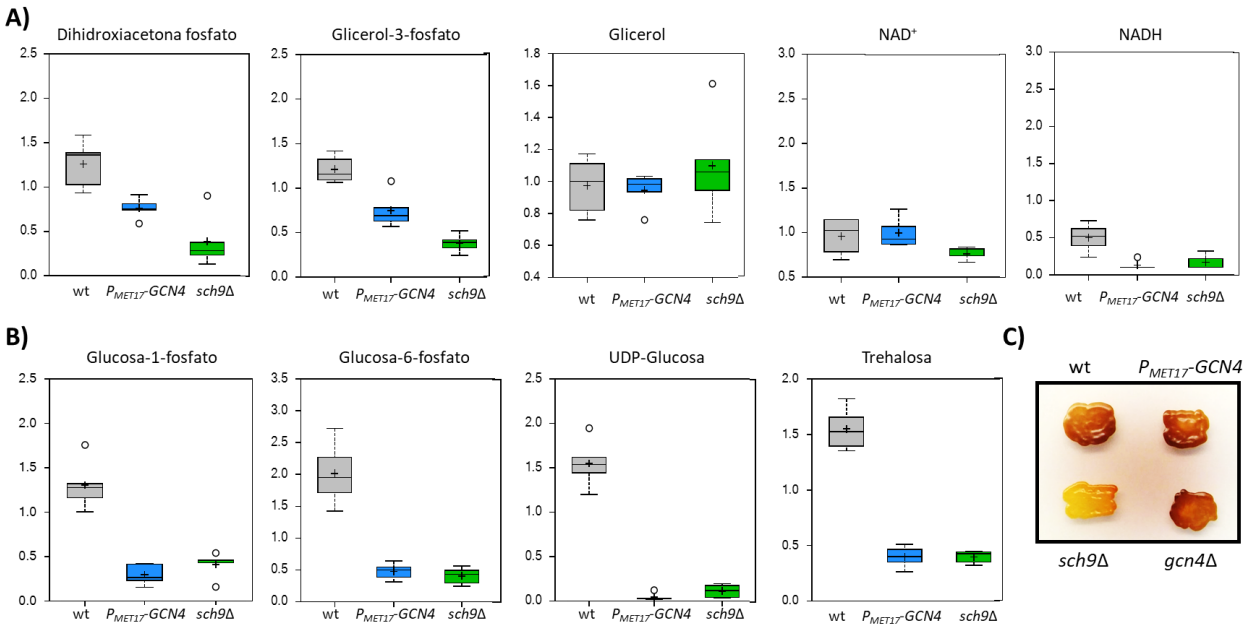
Los ácidos grasos hidroxilados (2-hidroxipalmitato, 2-hidroxiestearato, 3-hidroximiristato, 3-hidroxipalmitato, 3-hidroxiestearato, 9-hidroxiestearato) se acumulan en el mutante *sch9Δ* más que en la cepa control (Tabla 13), lo que es un indicativo de estrés oxidativo, en concreto, de la peroxidación de la membrana plasmática (Halliwell y Gutteridge, 1986). Sin embargo, los metabolitos relacionados con el metabolismo del glutatión, implicado en la protección frente a estrés oxidativo, se encuentran en menor cuantía en el mutante, lo que podría estar relacionado con la menor acumulación de aminoácidos. Conjuntamente estos datos sugieren que el mutante *sch9Δ* podría tener afectada la respuesta a estrés oxidativo, lo que es consistente con su mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno, Figura 83 panel B.

El mutante *sch9Δ* presenta niveles elevados de fosfolípidos, esfingolípidos, esteroides como el fucosterol y el ergosterol, y bajos de glicerol-3-fosfato y colina (Tabla 13), entre otros, lo que podría afectar a la composición y estructura de su membrana plasmática, cuya correcta remodelación es importante para hacer frente a las condiciones físico-químicas específicas de la vinificación. La proteína quinasa Sch9p estaría implicada en dicha remodelación y adaptación a las condiciones ambientales. La acumulación de ergosterol (Tabla 13), obtenida del análisis metabolómico, correlaciona con la acumulación de mRNA correspondientes a genes implicados en la síntesis de ergosterol detectada en el análisis transcriptómico (Tabla 10). El conjunto de estos resultados sugieren una conexión entre la síntesis de lípidos y la respuesta frente al ayuno de nitrógeno a través de la proteína Sch9p. Otros estudios globales han mostrado que la delección de *SCH9* tiene como consecuencia una disminución de la transcripción de genes relacionados con la síntesis de ergosterol, sugiriendo que desequilibrios entre la señalización de la disponibilidad de nitrógeno y el metabolismo de los lípidos afectan en gran medida a la viabilidad celular (Tesnière et al., 2013). Sin embargo, la diferencia de condiciones de crecimiento entre dichos experimentos, realizados en mostos con limitación de lípidos y exceso de nitrógeno, y nuestro estudio puede justificar la aparente discrepancia. La mayor acumulación de ergosterol que se observa en el mutante *sch9Δ* en nuestras condiciones podría reflejar una respuesta a un posible desequilibrio lipídico en dicho mutante, que valdría la pena investigar.

Respecto a la sobreexpresión del gen *GCN4*, los resultados obtenidos son consistentes con su función de activador transcripcional de genes codificantes de enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos, ya que produce niveles elevados de la mayor parte de aminoácidos respecto de la cepa silvestre, especialmente de glutamato, precursor de otros compuestos nitrogenados, y aspartato (Tabla 13). Los niveles de prolina y glutamina no se ven afectados a pesar de ser derivados del glutamato. También se observaron niveles elevados de aminoácidos aromáticos y compuestos procedentes del catabolismo del triptófano, de la fenilalanina, la tirosina y de la lisina indicando que Gcn4p afecta también al catabolismo de los aminoácidos. Intermediarios del metabolismo de la leucina (2-isopropilmalato), la fenilalanina (4-hidroxifenilpiruvato) y la metionina (homocisteína) se encuentran en niveles elevados mientras que otros metabolitos también intermediarios de los mismos aminoácidos se encuentran en niveles reducidos (o-acetilhomoserina e histidinol) (Tabla 13). La acumulación de  $\gamma$ -glutamil aminoácidos, de una reducción de disulfuro de cisteinglutatión, oftalmato y cisteinglicina y de unos niveles no alterados de glutatión reducido y oxidado sugieren que el transporte de  $\gamma$ -glutamil aminoácidos se encuentra aumentado indicando que las células utilizan los aminoácidos que forman parte de análogos del glutatión, como el oftalmato, para satisfacer los requerimientos de nitrógeno celulares (J. Jaspers et al., 1985; Mehdi y Penninckx, 1997).

Los niveles elevados de aminoácidos proteinogénicos junto con la disminución de la concentración de intermediarios glicolíticos indican que la sobreexpresión de *GCN4* conduce a una biosíntesis *de novo* de aminoácidos a expensas de esqueletos carbonatados procedente de la glicólisis, si bien es cierto que el catabolismo de los aminoácidos también parece estar implicado en menor medida.

Tanto en el mutante *sch9Δ* como en la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4*, *P<sub>MET17</sub>-GCN4*, los metabolitos relacionados con el metabolismo del carbono, especialmente la glicólisis se encuentran en menor concentración (Figura 84 panel B), lo que conlleva también cambios en la concentración de azúcares (Tabla 13). En el panel A de la Figura 85 se muestran los metabolitos implicados en la síntesis de glicerol y los cofactores  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$ . Tanto la dihidroxiacetona-P como el glicerol-3-P, ambos precursores del glicerol, presentan niveles inferiores respecto de la cepa silvestre. No se observan diferencias significativas en la concentración intracelular de glicerol en la cepa silvestre, el mutante *sch9Δ* ni en la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4* (*P<sub>MET17</sub>-GCN4*); sin embargo, la concentración de glicerol extracelular en *sch9Δ* y la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4* es mayor que la observada intracelularmente lo que podría explicarse por diferencias en el transporte. La relación entre  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  está altamente regulada ya que constituye el poder reductor de la célula. No se observan diferencias en los niveles de  $\text{NAD}^+$  en ambas cepas y los niveles de  $\text{NADH}$  son ligeramente inferiores que en la cepa silvestre (Figura 85 panel A). Los niveles de polisacáridos de reserva también varían en ambas cepas. En el panel B de la Figura 85 se muestra que los niveles de trehalosa son menores, lo que podría explicar la menor tolerancia del mutante *sch9Δ* a ciertos estreses. Los monosacáridos fosforilados, precursores de polisacáridos, también se encuentran reducidos en estos mutantes y, en una tinción con yoduro se observó que el mutante *sch9Δ* acumula menos glucógeno, Figura 85 panel C, mientras que *P<sub>MET17</sub>-GCN4* y el mutante *gcn4Δ* lo acumulan con normalidad. Dado el papel del glucógeno en condiciones de ayuno de fuente de carbono, esta diferencia entre los mutantes *sch9Δ* y *gcn4Δ* puede condicionar sus características en respuesta a estrés y en longevidad.



**Figura 85.** Acumulación intracelular de los metabolitos en condiciones de vinificación en MS300 de la cepa silvestre (gris), el mutante *sch9Δ* (verde) y la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4* (azul). Acumulación de metabolitos relacionados con la síntesis de glicerol y niveles de NAD<sup>+</sup> (dinucleótido de nicotinamida y adenina) y NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) en las cepas anteriormente indicadas (A). Acumulación de metabolitos relacionados con la producción de polisacáridos y trehalosa en las mismas cepas (B). Tinción con yoduro de las cepas analizadas en los apartados anteriores (C). El glucógeno se detectó por tinción con vapores de yodo de las cepas cultivadas durante 2 días hasta que se obtuvo el color visualizado.

**Tabla 13.** Metabolitos principales cuyos niveles intracelulares varían entre el mutante *sch9Δ* o la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4* y la cepa silvestre (C9, WT). En rojo y verde se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia, respectivamente, en comparación con la condición control con un estadístico de  $p \leq 0.05$ . En rosa claro y verde claro se muestran los metabolitos que tienen una mayor o menor abundancia respectivamente con respecto al control con un estadístico  $p \leq 0.1$ . En negro, los metabolitos cuyos niveles no varían. \* indica compuestos que no han sido confirmados frente a un estándar. GPC: Glicerofosforilcolina; GPE: Glicerofosforetanolamina; GPS: Glicerofosfoserina; GPG: Glicerofosfoglicerol.

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> <sup>-</sup> GCN4/WT
<b>Aminoácidos proteinogénicos</b>		
Alanina	0.67	1.05
Arginina	0.58	0.73
Asparagina	0.75	1.25
Aspartato	1.02	1.31
Cisteína	0.43	0.57
Fenilalanina	0.66	1.13
Glicina	0.65	1.03
Glutamato	0.97	2.0

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> <sup>-</sup> GCN4/WT
Histidina	0.67	1.42
Isoleucina	0.64	0.95
Leucina	0.69	1.15
Lisina	1.03	5.3
Metionina	0.74	1.45
Prolina	0.64	0.92
Serina	0.68	1.53
Tirosina	0.59	1.67
Treonina	0.84	1.28

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> <sup>-</sup> GCN4/WT
Triptófano	0.59	1.33
Valina	0.75	1.13
Glutamina	0.66	0.93
<b>Derivados de aminas cuaternarias</b>		
Betaina	0.75	0.67
Colina	0.42	0.98
Trigonelina	0.96	0.44
<b>Metabolismo de sacarosa, glucosa y fructosa</b>		
6-fosfogluconato	0.68	1.06
Fructosa	0.63	0.84
Galactonato	0.17	1.31
Gluconato	0.42	2.35
Manosa-6-fosfato	0.14	0.2
Rafinosa	0.46	0.59
Ramnosa	0.32	0.29
Trehalosa	0.26	0.26
Trehalosa 6-fosfato	0.26	0.46
<b>Polialcoholes</b>		
Arabitol/Xilitol	0.53	0.27
Eritritol	0.78	1.86
Manitol/Sorbitol	0.38	1.69
<b>Ácidos grasos hidroxilados</b>		
2-hidroxiestearato	8.38	3.5
2-hidroxipalmitato	6.51	3.34
3-hidroxiestearato	5.79	5.67
3-hidroximiristato	3.82	5.13
3-hidroxipalmitato	5.55	12.99
9-hidroxiestearato	6.66	7.71
<b>Fosfolípidos</b>		
1,2-dioleoil-GPC (18:1/18:1)*	28.33	7.21
1,2-dioleoil-GPE (18:1/18:1)	9.64	4.26
1,2-dipalmitoil-GPC (16:0/16:0)	2.42	2.01
1,2-dipalmitoleoil-GPC (16:1/16:1)*	14.31	3.09
1-estearoil-2-oleoil-GPC (18:0/18:1)	4.91	1.66
1-estearoil-2-oleoil-GPE (18:0/18:1)	4.5	2.08
1-estearoil-2-oleoil-GPI (18:0/18:1)*	2.35	2.01
1-estearoil-GPG (18:0)	1.91	1.39
1-estearoil-GPI (18:0)	1.11	1.13
1-estearoil-GPS (18:0)*	2.16	0.28

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> <sup>-</sup> GCN4/WT
1-oleoil-2-linoleoil-GPC (18:1/18:2)*	8	2.77
1-oleoil-2-linoleoil-GPE (18:1/18:2)*	2.43	1.06
1-oleoil-GPC (18:1)	1.56	0.65
1-oleoil-GPE (18:1)	4.39	1.33
1-oleoil-GPI (18:1)*	1.62	0.51
1-oleoil-GPS (18:1)	6.48	0.91
1-palmitoil-2-estearoil-GPC (16:0/18:0)	2.74	1.98
1-palmitoil-2-linoleoil-GPC (16:0/18:3)*	6.29	3.93
1-palmitoil-2-oleoil-GPC (16:0/18:1)	3.85	2.13
1-palmitoil-2-oleoil-GPE (16:0/18:1)	3.47	1.93
1-palmitoil-2-oleoil-GPS (16:0/18:1)	6.33	1.77
1-palmitoil-2-palmitoleoil-GPC (16:0/16:1)*	4.39	2.22
1-palmitoil-GPC (16:0)	1.48	1.12
1-palmitoil-GPE (16:0)	1.87	0.88
1-palmitoil-GPG (16:0)*	1.43	1.03
1-palmitoil-GPI (16:0)*	1.69	1.33
1-palmitoleoil-2-linoleoil-GPC (16:1/18:2)*	13.55	3.86
1-palmitoleoil-2-oleoil-glicerol (16:1/18:1)*	5.12	3.48
1-palmitoleoil-2-oleoil-GPC (16:1/18:1)*	9.15	2.59
1-palmitoleoil-3-oleoil-glicerol (16:1/18:1)*	6.14	5.14
1-palmitoleoil-GPC (16:1)*	3.84	2.45
1-palmitol-GPS (16:0)*	3.72	0.8
1-stearoil-GPC (18:0)	2.08	0.94
1-estearoil-GPE (18:0)	1.24	0.57
2-dimetilaminoetanol	0.78	0.65
2-estearoil-GPE (18:0)*	1.06	0.47
Citidina-'5'-difosfoetanolamina	0.35	0.21
Colina	1.92	0.42
Glicerofosfoetanolamina (GPE)	1.12	1.11
Glicerofosfoglicerol (GPG)	0.43	0.54
Glicerofosfoinositol*	0.63	0.73
Glicerofosforilcolina (GPC)	1.19	0.65
Glicerol 3-fosfato	0.67	0.31

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> - GCN4/WT
<b>Esfingolípidos</b>		
3-cetosfinganina	5.37	5.2
Esfinganina	3.6	3.15
Esfinganina-1-fosfato	3.65	0.81
Esfingosina	2.58	1.62
Fitosfingosina	4.82	2.21
<b>Esteroles</b>		
Ergosterol	2.06	1.88
Fucoesterol	2.87	2.04
<b>Aminoácidos aromáticos</b>		
3-(4-hidroxifenil)lactato	0.92	4.31
4-hidroxifenilpiruvato	3.39	14.86
Fenetilamina	0.95	1.25
Fenillactato (PLA)	0.82	5.38
Fenilpiruvato	2.77	6.78
Indolelactato	0.69	0.78
Metil indol-3-acetato	2.24	4.08
N-acetilfenilalanina	0.79	1.56
N-acetiltirosina	0.65	3.49
N-acetiltryptofano	1.06	0.78
N-formilfenilalanina	1.63	1.49
Picolinato	0.7	0.84
Quinato	0.43	0.15
Quinurenato	1.72	2.72
Quinurenina	0.64	0.22
Siquimato	0.25	0.85
Triptamina	0.28	6.07
Xanturanato	5.28	15.32
<b>Catabolismo aminoácidos</b>		
2-isopropilmalato	1.11	1.77
4-hidroxifenilpiruvato	3.39	14.86
Histidinol	0.15	0.03
Homocisteína	4.22	3.89
o-acetilhomoserina	0.73	0.22
<b>Metabolismo del glutatión</b>		
5-oxoprolina	0.97	0.98
Cisteinilglicina	0.69	0.61
Disulfuro de cisteínglutatión	0.57	0.4
gamma-glutamyl-2-aminobutirato	0.97	5.28
gamma-glutamylalanina	1.28	5.48
gamma-glutamylcisteína	0.84	3.75
gamma-glutamyl-epsilon-lisina	0.89	2.41

Ruta Metabólica y Metabolitos	<i>sch9Δ</i> /WT	P <sub>MET17</sub> - GCN4/WT
gamma-glutamylfenilalanina	0.91	3.81
gamma-glutamylglicina	0.48	1.13
gamma-glutamylglutamato	1.37	3.54
gamma-glutamylglutamina	0.67	1.28
gamma-glutamylhistidina	1.16	2.11
gamma-glutamylisoleucina*	0.63	2.17
gamma-glutamilleucina	0.99	3.24
gamma-glutamilmethionina	0.75	3.17
gamma-glutamiltirosina	1.03	19
gamma-glutamyltreonina*	0.93	2.8
gamma-glutamyltryptofano	0.43	0.92
gamma-glutamylvalina	0.7	2.92
Glutatión, oxidado (GSSG)	0.76	0.93
glutatión, reducido (GSH)	0.71	0.75
Oftalmato	0.37	0.62
S-lactoilglutatión	0.6	1.29
S-metilglutatión	0.53	0.96

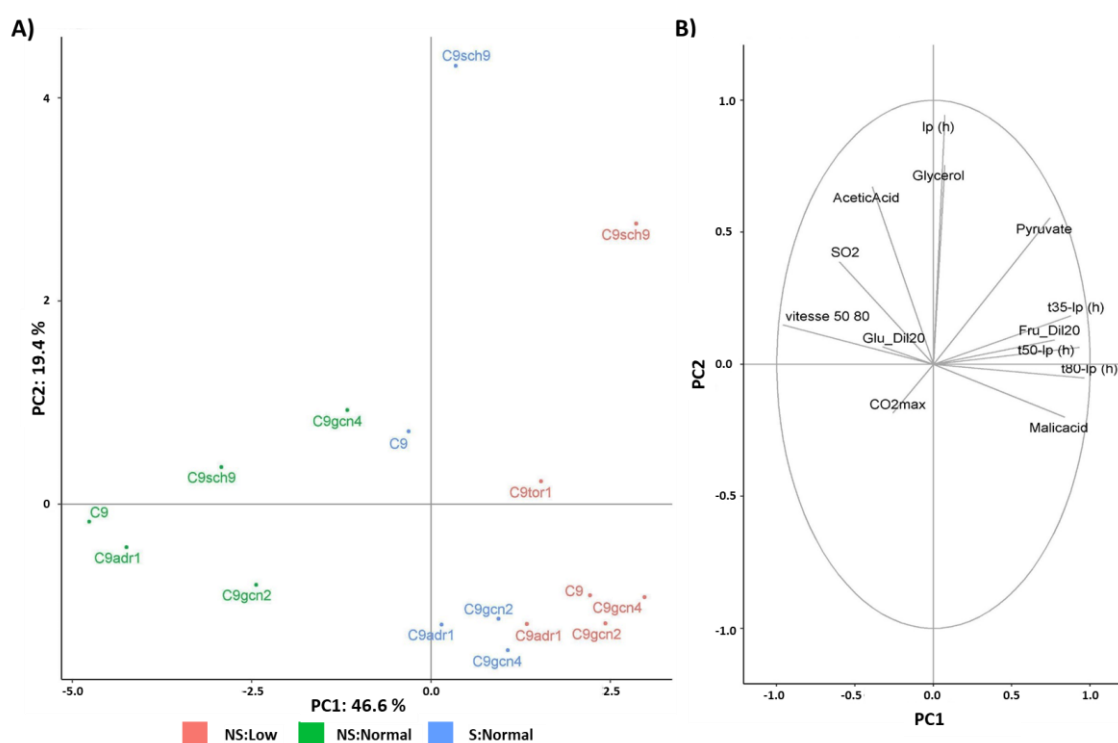
### 1.7. Análisis fenómico de la delección de Sch9p y de mutantes relacionados en condiciones de vinificación

Tal y como se ha mostrado anteriormente, la proteína quinasa Sch9p está implicada en la producción de glicerol y otros metabolitos de interés enológico. Además, su delección modifica tanto el perfil de expresión génica como la acumulación de ciertos metabolitos. Para profundizar en la función de *SCH9* en condiciones de vinificación se llevó a cabo un análisis fenómico mediante fermentaciones estandarizadas a gran escala durante la estancia en el laboratorio del Dr. Philippe Marullo. Se analizaron tanto parámetros cinéticos como enológicos (indicados más adelante) del mutante *sch9Δ*, dentro de un estudio más amplio que incluye genes representantes de las principales rutas de respuesta a nutrientes (ver más abajo). Además, en este caso, se añadieron al estudio los mutantes *tor1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn4Δ*, *adr1Δ*, *ypk3Δ* y *gtr1Δ*. *TOR1*, *YPK3* y *GTR1* pertenecen a la ruta del complejo TORC1. Los mutantes de delección en genes implicados en el control general de aminoácidos (*gcn2Δ* y *gcn4Δ*) se incluyeron debido a la interacción entre los genes *SCH9* y *GCN4* que se definió en apartados anteriores. Por otra parte, los resultados de los análisis transcriptómico y metabolómico indicaron que el metabolismo de los ácidos tricarboxílicos estaba alterado en el mutante *sch9Δ*, al igual que las proteínas peroxisomales. Por ello, también se añadió al análisis fenómico el mutante *adr1Δ* ya que es uno de los principales factores transcripcionales que actúa en la biogénesis de peroxisomas y en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, como el glicerol o el etanol.

El análisis se realizó en mosto Sauvignon Blanc en tres condiciones diferentes: mosto suplementado (250 mg/L YAN) en agitación (S:Normal) o en estático (NS:Normal) o bien con el mosto sin suplementar (100 mg/L YAN) y, por tanto, con baja concentración de nitrógeno en condiciones estáticas (NS:Low). La condición NS:Normal es la más parecida a las condiciones de fermentación en bodega por lo que puede considerarse como la condición de referencia; la condición S:Normal permite determinar el efecto del oxígeno y la influencia de la respiración; y la condición NS:Low se considera un ayuno relativo de nitrógeno. Por motivos técnicos, el mutante *tor1Δ* únicamente pudo medirse en condiciones de no agitación en el mosto no suplementado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos (*l<sub>p</sub>*, *t<sub>35/50/80-l<sub>p</sub></sub>*, *v<sub>50\_80</sub>*) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa.

En la Figura 86 se muestra un análisis global de las fermentaciones realizadas con los mutantes anteriormente comentados. El análisis de componentes principales (panel A) muestra la agrupación de las cepas analizadas mediante el eje horizontal, cuya varianza es mayor (más información), y el eje vertical, el cual agrupa el siguiente valor de varianza menor que PC1. En este caso, el 66 % de la varianza de los datos (46.6 PC1 y 19.4 % PC2) es recogida en los dos componentes principales. En el PCA, la correlación positiva o negativa de las muestras analizadas frente a los componentes principales viene determinada por el signo de ese componente principal. En el caso de la condición NS:Normal (color verde), más similar a las condiciones de fermentación industrial, se observa que las cepas analizadas se agrupan en los valores negativos del eje PC1 pero respecto al eje PC2 tanto el mutante *sch9Δ* como *gcn4Δ* muestran una agrupación diferente, ya que presentan valores positivos y el resto de las cepas analizadas (*C9*, *adr1Δ* y *gcn2Δ*) valores negativos. En medio pobre en nitrógeno (NS:Low, color rojo) las delecciones de los genes *SCH9* y *TOR1* difieren más del silvestre que *gcn2Δ* o *gcn4Δ*,

sugiriendo que la señalización a través de TORC1 es más relevante que el GAAC en estas condiciones. La oxigenación causada por la agitación (S:Normal, color azul) tiene un efecto importante, pero opuesto, en el mutante *sch9Δ* y los mutantes *gcn2Δ*, *gcn4Δ* y *adr1Δ*, que se encuentran agrupados. En el panel B se muestra el círculo de correlación de los parámetros analizados durante la fermentación. La longitud de la flecha indica la aportación de cada parámetro a la agrupación observada en el PCA del panel A. Cuanto más lejos esté del origen (mayor longitud de la flecha) mayor representación presentará dicho parámetro en el PCA mostrado en el panel A. Como consecuencia, cuantos más componentes principales se necesiten para definir un parámetro analizado, más cerca del origen del círculo de correlación se encontrará (flecha más corta). Por otra parte, hay que fijarse en la relación de las variables y su posición en el gráfico. Si las variables están cerca (ángulo pequeño), la relación es positiva; si el ángulo es de 90 °, no hay relación alguna; mientras que si están en lados opuestos (ángulo 180 °), la relación es negativa. A destacar la correlación positiva observada entre la fase de latencia (Ip) y el glicerol en los mutantes analizados en las tres condiciones experimentales. Los tiempos para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>, debido a la agrupación conjunta que presentan, se correlacionan positivamente. También se observa cierta correlación positiva de los parámetros anteriormente comentados (t35-50-80-Ip) con la fructosa residual (Fru\_Dil20); sin embargo, al igual que para la glucosa residual (Glu\_Dil20), la corta flecha observada indica que dichos parámetros presentan mayor variabilidad de los datos por lo que la correlación observada de estos parámetros con el resto es débil. El piruvato y el CO<sub>2</sub> se encuentran en lados completamente opuestos, reflejando la relación metabólica negativa entre ambos parámetros, aunque los datos de CO<sub>2</sub> no se representan adecuadamente por el componente principal 1 y 2 (flecha corta).



**Figura 86.** Análisis fenomíco de los mutantes de deleción en genes del control general de aminoácidos y de la ruta TOR en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de los mutantes *adr1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn4Δ*, *sch9Δ* y *tor1Δ* (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como



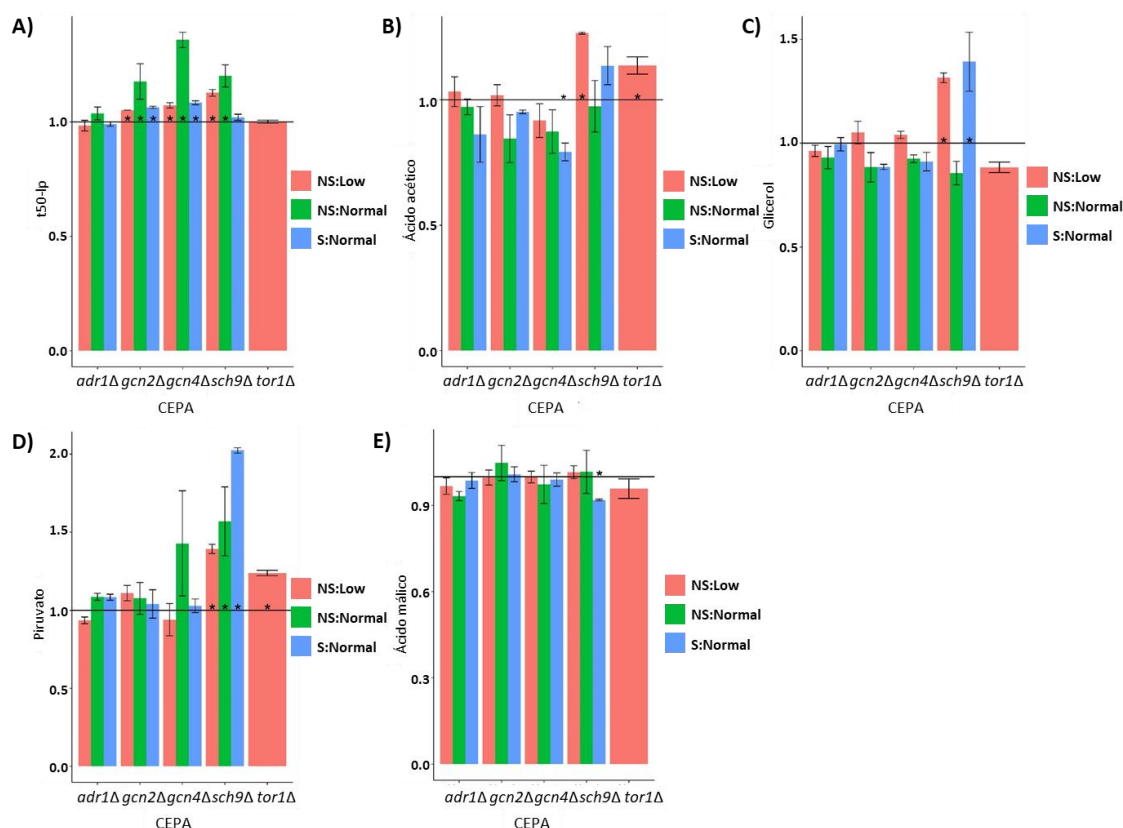
enológicos, medidos durante la fermentación (**B**). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not Shaken: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, Shaken: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, Not Shaken:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (lp), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta lp (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_dil20 y Fru\_dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

En este caso, se ha optado por la representación de los valores normalizados frente a la cepa silvestre C9 para poder comparar así todos los mutantes analizados. Los resultados de los parámetros más relevantes se muestran en la Figura 87. Tanto los mutantes en el control general de aminoácidos (*gcn2Δ* y *gcn4Δ*) como el mutante *sch9Δ* presentan una capacidad fermentativa reducida ya que tardan más en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> (panel A). Sin embargo, el mutante *tor1Δ* no presenta ningún retraso en la fermentación a pesar de encontrarse en un mosto con una concentración de nitrógeno deficiente (NS:Low, rojo). Todos los mutantes son capaces de finalizar la fermentación y no se observan diferencias ni en la glucosa ni en la fructosa residual (datos no mostrados). Los resultados correspondientes al ácido acético y al glicerol son los esperados (paneles B y C) ya que coinciden con los obtenidos previamente para el mutante *sch9Δ* (Figura 75 paneles E y F), acumulación de glicerol y de piruvato. A destacar el mutante *tor1Δ*, que presenta una menor concentración de glicerol, al contrario que *sch9Δ*, y una mayor concentración de ácido acético. El mutante *sch9Δ* presenta una mayor concentración de glicerol y también una mayor concentración de ácido acético en las condiciones NS:Low (barra roja) y S:Normal (barra azul). Sin embargo, no presenta una acumulación de dichos metabolitos en la condición NS:Normal. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos anteriormente (Figura 75 panel E y F) donde en mosto Tempranillo presenta una acumulación de glicerol y de ácido acético. En dichas condiciones el mosto Tempranillo no se encuentra suplementado, por lo que la situación nutricional varía en cuanto a la concentración de fuente de nitrógeno. Por otro lado, esa mayor acumulación de acético tampoco coincide con lo observado en condiciones de laboratorio, donde la delección *sch9Δ* induce el catabolismo del ácido acético para promover la acumulación de trehalosa y con ello, aumentar la longevidad (Hu et al., 2014). Sin embargo, el aumento de la longevidad en condiciones de laboratorio tampoco es un fenotipo de la mutación en el gen *SCH9* observado en condiciones de vinificación. Respecto al piruvato (panel D), el mutante *sch9Δ* presenta una acumulación en todas las condiciones analizadas. La acumulación extracelular de piruvato en el mutante *sch9Δ* sugiere que la proteína quinasa Sch9p está implicada en la movilización del piruvato ya que los niveles intracelulares no varían con la delección (Figura 84 panel B). Dicha acumulación extracelular pero no intracelular sugiere que parte del piruvato intracelular se distribuye a otros destinos metabólicos y la otra parte se excreta al exterior mediante mecanismos adicionales de transporte. Al ser un intermediario del metabolismo de los azúcares, el piruvato puede ser dirigido hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la respiración, hacia la fermentación alcohólica o hacia la carboxilación anaplerótica a oxalacetato.

El ácido málico y el tartárico constituyen hasta el 90 % de los ácidos orgánicos presentes en el mosto. El ácido málico es importante pues, al poder ser utilizado como fuente de carbono por parte de las bacterias acidolácticas, puede dar lugar a contaminaciones. Además, también

contribuye al sabor ácido del vino (Pretorius, 2000). A diferencia de las bacterias ácido lácticas las cuales descarboxilan el ácido málico a piruvato, la mayor parte de cepas comerciales de *S. cerevisiae* son incapaces de degradar el ácido málico a lo largo de la fermentación alcohólica (Volschenk et al., 2006). Como consecuencia, la concentración de ácido málico es muy similar en todos los mutantes estudiados a excepción de *sch9Δ* en S:Normal cuya concentración es menor, coincidiendo con una mayor acumulación de piruvato.



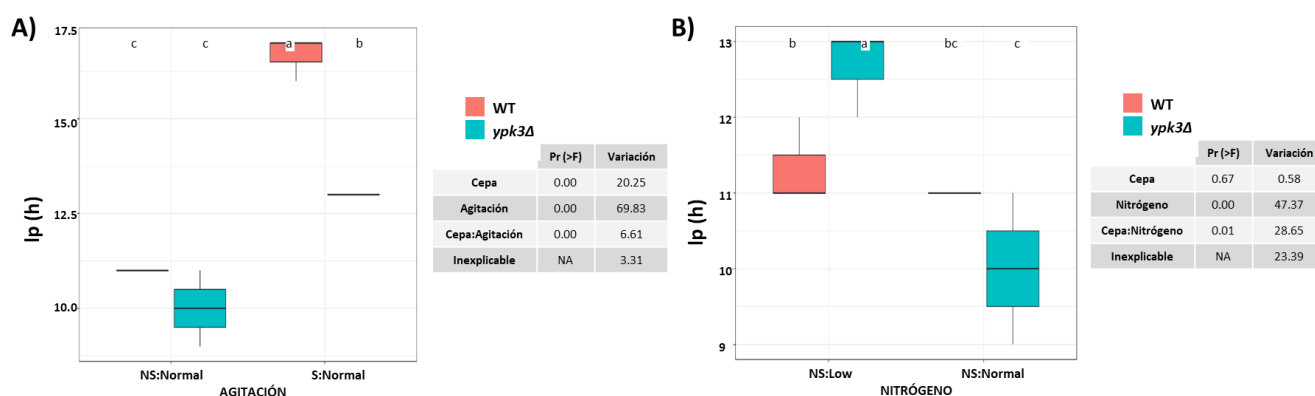
**Figura 87.** Análisis de parámetros cinéticos y enológicos en vinificaciones en mosto Sauvignon Blanc de los mutantes *adr1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn4Δ*, *sch9Δ* y *tor1Δ*. Los parámetros: tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-lp) (A), ácido acético (B), glicerol (C), piruvato (D) y ácido málico (E) se expresan en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9. Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S: *Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

A lo largo de este primer apartado del Capítulo 2, se ha analizado el papel de la proteína quinasa Sch9p y del activador transcripcional Gcn4p en condiciones de vinificación para profundizar en los mecanismos moleculares que conectan la ruta TOR/Sch9p y el control general de aminoácidos (GAAC). A su vez, se ha determinado que la mayor acumulación de glicerol del mutante *sch9Δ* es consecuencia de una mayor cantidad inicial de proteína Gpd1p en condiciones de fermentación vínica, vinculada a la localización peroxisomal, lo que podría afectar a su estabilidad. La aparente contradicción entre la mayor longevidad cronológica del mutante *sch9Δ* en condiciones de laboratorio y la menor longevidad en condiciones de

vinificación, a pesar de producirse la acumulación de glicerol en ambas condiciones sugiere otros defectos metabólicos que superan el efecto protector del glicerol.

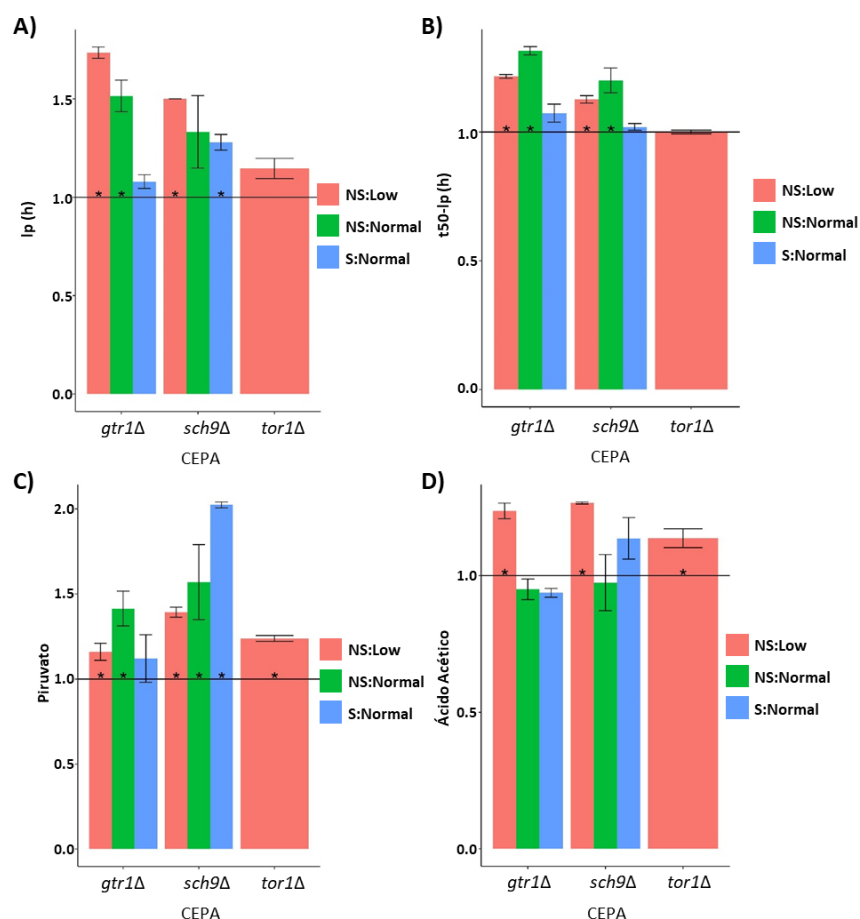
Por otra parte, Sch9p es considerado un regulador central de la fisiología celular que coordina numerosos procesos celulares y cuya actividad depende del medio de crecimiento. Sin embargo, los análisis metabolómicos han mostrado que el factor transcripcional Gcn4p también tiene un impacto en el metabolismo celular bajo condiciones de vinificación, no sólo afectando al metabolismo del nitrógeno sino también al metabolismo central del carbono.

Paralelamente también se analizó el mutante *ypk3Δ*. Ypk3p es una proteína quinasa, fosforilable vía TORC1, que fosforila a su vez a la proteína ribosomal Rps6p (Capítulo 1 apartado 6.2.1) (González et al., 2015). Por lo tanto, la señalización producida a través de la fosforilación de Ypk3p constituye también otra rama metabólica que actúa por debajo del complejo TORC1. En la Figura 88 se muestran los datos de la fase de latencia obtenidos en las tres condiciones analizadas. En este caso, se opta por representar los datos mediante diagramas de caja para poder analizar tanto el efecto de la agitación (panel A) como el del nitrógeno (panel B). Las tablas asociadas a los diagramas de caja indican en porcentaje la influencia que tiene la delección del gen *YPK3* (cepa), las diferencias en la agitación (Agitación) y las relación entre la delección y la agitación (Cepa:Agitación), así como el porcentaje de la variación debida al azar. Lo mismo se observa en el panel B pero en las condiciones de nitrógeno. De todos los parámetros analizados, únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas en la fase de latencia (Ip) entre el mutante *ypk3Δ* respecto de la cepa silvestre. En el panel A se muestra la influencia de la agitación en la fase de latencia. El 69.83 % de la variación observada en la fase de latencia se debe a la agitación mientras que únicamente el 20.25 % es explicada por la delección del gen *YPK3*. Se observa que en condiciones más similares a las de laboratorio (S:Normal), la delección del gen *YPK3* reduce la fase de latencia de manera estadísticamente significativa mientras que la reducción observada para la condición industrial NS:Normal no es significativa. En el panel B se observa la influencia de la concentración de nitrógeno en la fase de latencia. En este caso, el 47.37 % de la variabilidad puede explicarse por la concentración de nitrógeno normal (NS:Normal) y baja (NS:Low); sin embargo, lo más interesante es que el efecto de la delección del gen *YPK3* depende del medio. Cuando la concentración de nitrógeno es adecuada, su delección disminuye la fase de latencia mientras que en concentración limitante de nitrógeno se produce una extensión de la fase de latencia. El aumento de la fase de latencia en NS:Low es consistente con la implicación de la ruta TORC1 en la fosforilación de Ypk3p y la activación de la rama de síntesis de proteínas y ribosomas (Figura 5) ya que al estar inhibido el complejo TORC1, debido a la baja concentración de nitrógeno, dicha rama se encuentra inhibida dificultando así la adaptación al nuevo medio.



**Figura 88.** Efecto de la delección de la quinasa Ypk3p en la fase de latencia en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Fase de latencia (lp, h), con agitación y concentración normal de nitrógeno (A) y sin agitación y en concentración de nitrógeno limitante (B). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:Shaken) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

También se analizó el mutante *gtr1Δ*, carente de una de las subunidades de la GTPasa Gtr1-Gtr2p que activa al complejo TORC1 en respuesta a aminoácidos. En este caso se optó por los valores normalizados de los parámetros analizados para poder realizar la comparación con la proteína quinasa Sch9p, la cual también forma parte de la ruta TOR. Los parámetros de los mutantes *gtr1Δ*, *sch9Δ* y *tor1Δ* se muestran en la Figura 89. Tanto la fase de latencia (panel A) como el tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> (panel B) se encuentran aumentados en el mutante *gtr1Δ* en las condiciones NS:Low (color rojo) y NS:Normal (color verde); sin embargo, ambos parámetros no se ven afectados en la condición S:Normal (color azul). Los cambios observados en los parámetros cinéticos y enológicos observados en la Figura 89 entre el mutante de *gtr1Δ* y *sch9Δ* son muy similares, diferenciándose en la acumulación de piruvato observada en el mutante *sch9Δ* en la condición S:Normal (panel C). El fenotipo compartido entre *gtr1Δ* y *sch9Δ* está en concordancia con lo esperado pues Gtr1p forma parte del complejo TORC1 y la proteína quinasa Sch9p es una de las dianas más caracterizadas de TORC1, sugiriendo que la mayor parte de los estímulos necesarios para la función de Sch9p durante la vinificación proceden de TORC1. Tanto el piruvato (panel C) como el ácido acético (panel D) se encuentran aumentados en la condición NS:Low para los tres mutantes analizados sugiriendo que la ruta TOR también tiene implicación en el metabolismo de los carbohidratos. Los resultados obtenidos tanto del mutante *ypk3Δ* como del mutante *gtr1Δ* sugieren que la detección o captación de aminoácidos al inicio de la fermentación, debido a que Ypk3p fosforila a Rps6p, y la consecuente modulación de la actividad de TORC1 (Gtr1p forma parte del complejo TORC1) es importante al inicio de la fermentación.



**Figura 89.** Comparación de los parámetros cinéticos y enológicos de las vinificaciones en mosto Sauvignon Blanc del mutante *gtr1Δ* con respecto a *sch9Δ* y *tor1Δ*. Valores en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9 de: la fase de latencia (lp, h) (A), el tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> (t50-lp, h) (B), el piruvato (C) y ácido acético (D). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:Shaken) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

## 2. Papel diferencial de los activadores transcripcionales Gat1p y Gln3p en condiciones de vinificación. Estudio en diversas cepas.

Uno de los mecanismos de regulación basado en disponibilidad de nutrientes que más se ha estudiado en *S. cerevisiae* es la represión catabólica de nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*), en la que intervienen los factores transcripcionales tipo GATA Gln3p y Gat1p, particularmente importante en condiciones enológicas donde el nitrógeno es un factor limitante. En condiciones de ayuno de nitrógeno o de desrepresión, Gln3p y Gat1p se acumulan en el núcleo induciendo la expresión de los genes regulados por la NCR. Sin embargo, en presencia de una buena fuente de nitrógeno, son retenidos en el citoplasma mediante la proteína Ure2p. Su regulación está sujeta principalmente a la actividad del complejo TORC1, pero también pueden ser regulados por Snf1p en función de la fuente de carbono (Bertram et al., 2002).

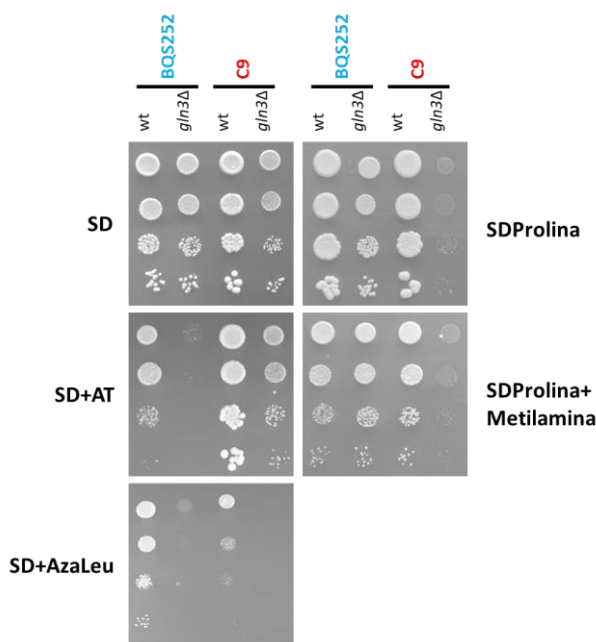
Mientras que en condiciones de laboratorio la fuente de nitrógeno por excelencia es el amonio, considerada una buena fuente de nitrógeno, en condiciones de vinificación las levaduras disponen de una mezcla de  $\alpha$ -aminoácidos y amonio a la que su metabolismo ha de adaptarse. En este apartado, se ha analizado los fenotipos de los mutantes simples *gat1Δ* y *gln3Δ* y el doble *gat1Δgln3Δ* en diversas cepas vínicas y cepas de laboratorio. Está descrito que la delección de los genes *GAT1* o *GLN3* en la cepa de laboratorio S288c aumenta la resistencia tanto a rapamicina como a cafeína (Homann et al., 2009; Huber et al., 2009; Xie et al., 2005). Además, un mutante *gln3Δ* es más tolerante al estrés oxidativo (Powers et al., 2006). Se ha comprobado también si la mayor resistencia a rapamicina de las cepas vínicas respecto de las cepas de laboratorio (descrita en el Capítulo 1) podría estar relacionado con los genes *GLN3* o *GAT1*.

### 2.1. Estudio del papel del factor transcripcional Gln3p en diversas cepas

#### 2.1.1. Análisis de la tolerancia del mutante *gln3Δ* frente a inhibidores químicos

Inicialmente, se construyeron los mutantes *gln3Δ* en los fondos genéticos BQS252 y C9 como representantes de cepa de laboratorio y cepa vínica, respectivamente. Posteriormente, se rastreó una serie de inhibidores relacionados con el metabolismo de compuestos nitrogenados. Se analizaron sus respectivos fenotipos en presencia de 3-amino-1,2,4-triazol y de 4-aza-D,L-leucina (azaLeu). El AT es un inhibidor competitivo de la imidazolglicerol-fosfato deshidratasa, codificada por el gen *HIS3*, que causa un ayuno específico de histidina mientras que la azaLeu es un análogo estructural tóxico de la leucina, usado para identificar mutantes en los transportadores de leucina (Roberg et al., 1997). Como se puede ver en la Figura 90, el mutante C9 *gln3Δ* presenta un crecimiento mayor en presencia de AT que el mutante BQS252 *gln3Δ* sugiriendo que la expresión del gen *HIS3* es más dependiente de Gln3p en la cepa de laboratorio, existiendo mecanismos alternativos en las cepas vínicas. La cepa vínica silvestre C9 muestra mayor tolerancia a AT que la cepa de laboratorio BQS252 utilizada como referencia, lo que corrobora este hecho. Sin embargo, se observa un mayor crecimiento de la cepa de laboratorio en presencia de azaLeu, lo que indica una menor capacidad para captar leucina. La delección de *GLN3* aumenta dicha sensibilidad en ambos fondos genéticos e impide completamente el crecimiento de la cepa vínica, más sensible de partida.

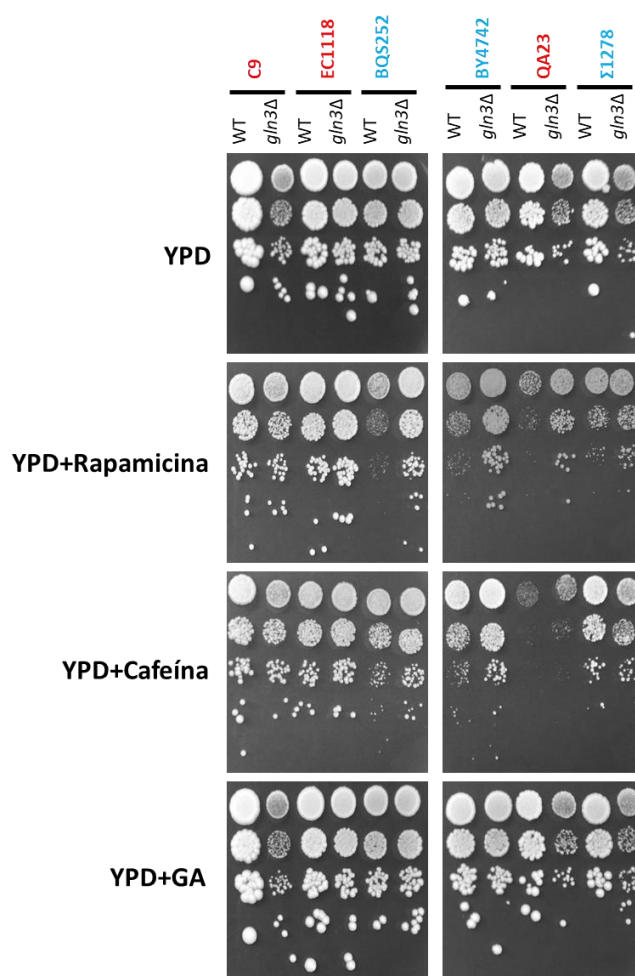
En la Figura 90 también puede observarse como la cepa vínica C9 no presenta problemas de crecimiento en un medio mínimo completo con prolina como única fuente de nitrógeno, mientras que su mutante *gln3Δ*, que no es capaz de inducir la NCR, no crece en dicho medio. El mismo comportamiento se ha observado en otras cepas vínicas, como QA23 (datos no mostrados). Sin embargo, el mutante BQS252 *gln3Δ* es capaz de crecer en un medio con prolina como única fuente de nitrógeno lo que sugiere una regulación diferente de la NCR. El análisis de crecimiento también se realizó en presencia de metilamina, un análogo tóxico no metabolizable del amonio que induce la NCR. Por ello, aquellas cepas que tengan desreprimida la utilización de la prolina, aún en presencia de una buena fuente de nitrógeno, presentarán una mayor resistencia al compuesto. El fenotipo observado en presencia de metilamina es muy similar entre las dos cepas, no parece haber diferencias basales en la desrepresión del uso de amonio. La mayor tolerancia del mutante en la cepa BQS252 persiste, lo que sugiere una desrepresión de la NCR en dicha cepa lo que le permite un mayor crecimiento en presencia de una fuente de nitrógeno no óptima, crecimiento no dependiente de Gln3p y que no afectaría de forma correspondiente al transporte de amonio.



**Figura 90.** Tolerancia del mutante *gln3Δ* en las cepas BQS252 y C9 frente a diversos inhibidores químicos relacionados con el metabolismo de los aminoácidos. Goteos en placa realizados en medio mínimo SD con 3-amino-1,2,4-triazol (AT, 10 mM) o 4-aza-D,L-leucina (AzaLeu, 2 g/L) o bien en medio mínimo con prolina (SDProlina) como fuente de nitrógeno (5 g/L) y con prolina y metilamina (4.8 g/L). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica.

Al observar las diferencias respecto a los inhibidores anteriormente comentados también se estudió la tolerancia frente a inhibidores de TORC1, como la rapamicina y la cafeína, e inhibidores de la síntesis de glutamina, como el glufosinato de amonio, y que inhiben indirectamente a TORC1, y se incluyeron además otras cepas (Figura 91). Como se ha comentado en el apartado 2 de este Capítulo, está descrito que un mutante *gln3Δ* en la cepa S288c es más resistente tanto a cafeína como a rapamicina, ambos inhibidores de TORC1. Este fenotipo se corrobora para todas las cepas analizadas salvo en C9 y EC1118, donde las diferencias de crecimiento no son tan apreciables. La mayor tolerancia frente a cafeína de *gln3Δ* no es tan apreciable como frente a rapamicina, aunque sigue observándose en los derivados de S288c. En cepas vínicas se observa un ligero aumento de tolerancia en QA23

tanto a rapamicina como cafeína, aunque dicha cepa presenta una mayor sensibilidad basal a cafeína, dicho efecto no es apreciable en el resto. Respecto al glufosinato de amonio, también puede observarse una cierta variabilidad en función de la cepa analizada. Al inhibir la glutamina sintetasa y causar un ayuno de nitrógeno es de esperar una desrepresión de la NCR, acción que los mutantes en *GLN3* no puede llevar a cabo. Como consecuencia, los mutantes *gln3Δ* en las cepas C9, QA23 y  $\Sigma$ 1278 presentan un menor crecimiento en presencia de GA. En contraposición, las cepas de laboratorio de fondo BQS252 y BY4742 presentan un crecimiento mayor en presencia de GA en los mutantes *gln3Δ* sugiriendo la existencia de un mecanismo diferente para evitar el ayuno de grupos amino al haber inhibido la síntesis de glutamina (principal donador de grupos amino).



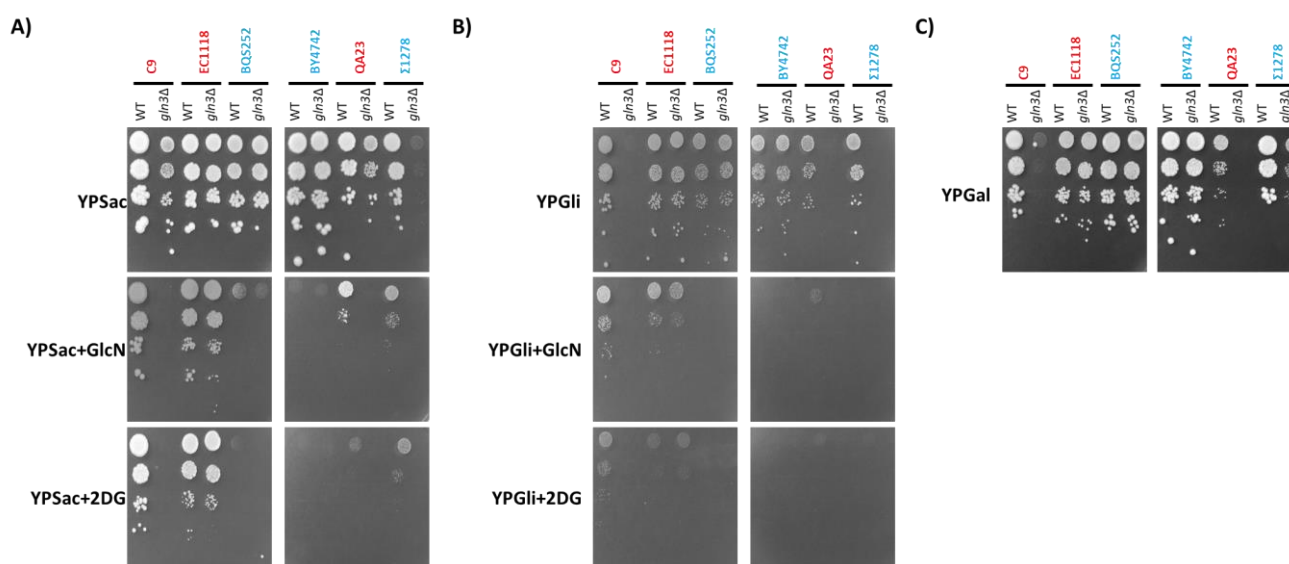
**Figura 91.** Análisis de crecimiento de los mutantes *gln3Δ* en diferentes fondos genéticos en presencia de inhibidores químicos. Goteos en placa en medio completo YPD con rapamicina (100 nM), cafeína (10 mM) o glufosinato de amonio (GA, 10 mg/L). WT: cepa silvestre. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vnicas.

Como experimento paralelo enfocado al metabolismo de fuente de carbono también se analizó el crecimiento en presencia de 2-desoxiglucosa y glucosamina, ambos análogos estructurales no metabolizables de la glucosa que impiden la utilización de sustratos alternativos (como la sacarosa y el glicerol), y en presencia de galactosa como fuente de carbono debido a la relación entre Snf1p y Gln3p (Bertram et al., 2002), Figura 92. En las cepas C9, QA23 y  $\Sigma$ 1278, el gen *GLN3* parece estar implicado en el uso de fuentes de carbono



alternativas ya que sus respectivos mutantes *gln3Δ* no crecen en presencia de glicerol (panel B) o galactosa (panel C) (efecto parcial en el caso de la cepa  $\Sigma 1278$ ). La presencia de un inductor de la represión por glucosa como 2DG o GlcN inhibe completamente el crecimiento de las cepas de laboratorio, y ocurre de manera similar con los mutantes de delección en el gen *GLN3* de la mayoría de las cepas vnicas, indicando que Gln3p es requerida para esa menor sensibilidad a la represión por glucosa. Los mutantes de delección construidos en las cepas EC1118, BQS252 y BY4742 son capaces de crecer en presencia de galactosa (panel C) como única fuente de carbono. Los fenotipos observados en YPSac, YPGli e YPGal se mantienen siendo más severos en presencia de glicerol como fuente de carbono. El mutante de delección EC1118 *gln3Δ* presenta un fenotipo diferente al del resto de cepas vnicas, sugiriendo una regulación diferente de la represión catabólica por glucosa y de la NCR.

La diversidad de fenotipos observados para los mutantes *gln3Δ* en función de la cepa sugiere que el uso de fuentes de carbono alternativas está regulado tanto por Snf1p como por Gln3p (Bertram et al., 2002). Las diferencias observadas en los fenotipos de los goteos mostrados en la Figura 90, Figura 91 y Figura 92, a diferencia del fenotipo frente a rapamicina, no son características de las cepas vnicas ni de las cepas de laboratorio.



**Figura 92.** Análisis de la represión catabólica por glucosa de mutantes *gln3Δ* en diferentes fondos genéticos. Goteos en placa en medio completo con sacarosa como fuente de carbono (A) o con glicerol (B) en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200  $\mu$ g/mL) de los mutantes *gln3Δ* y sus respectivas cepas silvestres. Goteos realizados en medio completo YPGal con galactosa como fuente de carbono (C). WT: cepa silvestre. Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vnicas.

### 2.1.2. Análisis fenómico del mutante *gln3Δ* en condiciones de vinificación

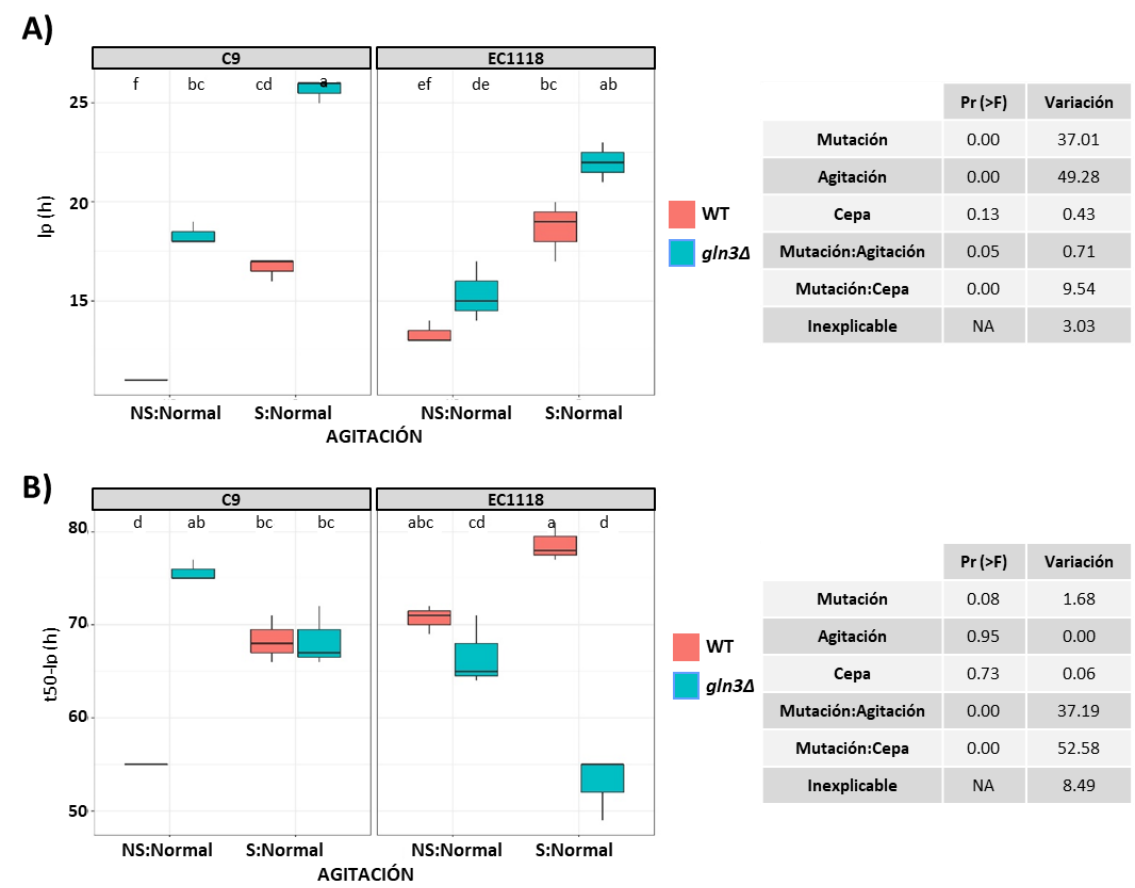
Dada la diversidad fenotípica de los mutantes de delección del gen *GLN3* en las diferentes cepas analizadas, se decidió extender su caracterización a condiciones de vinificación utilizando los mutantes en las cepas vnicas C9 y EC1118. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S: *Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos

(lp, t35/50/80-lp, v50\_80) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa.

La agitación favorece la transferencia de oxígeno al medio y está descrito que un mutante *gln3Δ* en el fondo genético S288c es más resistente a estrés oxidativo exógeno causado por paraquat y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, en condiciones de vinificación las levaduras crecen fermentativamente por lo que el oxígeno transferido como consecuencia de la agitación puede no producir un estrés oxidativo a nivel celular. Por otra parte, la presencia de oxígeno permite a la levadura catabolizar la prolina como fuente de nitrógeno a través de la prolina deshidrogenasa Put1p, aunque su transporte, realizado a través de Gap1p y Put4p, queda supeditado a la expresión de *GLN3* (Daugherty et al., 1993; Stanbrough y Magasanik, 1996). Por tanto, aunque la delección de *GLN3* conduce a un aumento de la resistencia a estrés oxidativo exógeno, también provoca una incapacidad de inducir la expresión de enzimas necesarias para el transporte de la prolina en condiciones de laboratorio por lo que sería esperable un efecto negativo en vinificación.

En la Figura 93 se muestra el efecto que produce la agitación en la fase de latencia (lp) (panel A) y el tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-lp) (panel B). En este caso, se ha optado por una representación mediante diagramas de caja para poder así comparar los fenotipos obtenidos de los mutantes de delección construidos en las diferentes cepas analizadas. Las tablas muestran el porcentaje de la variación que es explicada por la mutación, la agitación, la cepa, la relación entre la mutación y la agitación y entre la mutación y la cepa. Independientemente de las condiciones de agitación o no agitación, tanto el mutante C9 *gln3Δ* como el mutante EC1118 *gln3Δ* presentan una fase de latencia mayor que sus respectivas cepas silvestres (panel A); el análisis estadístico muestra que el 37.01 % de la variación observada se debe a la delección del gen *GLN3*. En este caso, también se observa que la agitación influye en la fase de latencia en casi la mitad de la variación observada (49.28 %) sugiriendo que Gln3p está implicada en la adaptación en las primeras etapas de fermentación. Sin embargo, cuando se analiza t50-lp (panel B), el mutante C9 *gln3Δ* pasa de mostrar un claro fenotipo de menor eficiencia fermentativa que su correspondiente cepa silvestre (mayor t50-lp) en condiciones de no agitación a ser indistinguible de ella en condiciones de agitación. El fenotipo del mutante EC1118 *gln3Δ* es completamente opuesto al descrito ya que su t50-lp es mucho menor que el de su correspondiente cepa silvestre en condiciones de agitación pero no cuando la fermentación se realiza en estático. Ese cambio de fenotipo tanto en condiciones de agitación como en función de la cepa en la que se construye el mutante de delección viene indicado por la relación entre mutación:cepa observado en la tabla en la que el 52.58 % de la variación se debe a dicha relación. La reducción de t50-lp observada en mutante EC1118 *gln3Δ* implica una mayor capacidad fermentativa, que junto con la reducción observada en la fase de latencia, supondría una mejora en la fermentación, sin tener en cuenta los parámetros enológicos. Es importante recordar aquí que los resultados obtenidos en los estudios de fosforilación de Gln3p del Capítulo 1 mostraron que Gln3p se encuentra activa hasta 1 día de fermentación lo que estaría en concordancia con el aumento de la fase de latencia observada en NS:Normal (panel A). Estos resultados sugieren que la función de Gln3p en esa primera etapa de la vinificación regula la extensión de la fase de latencia.

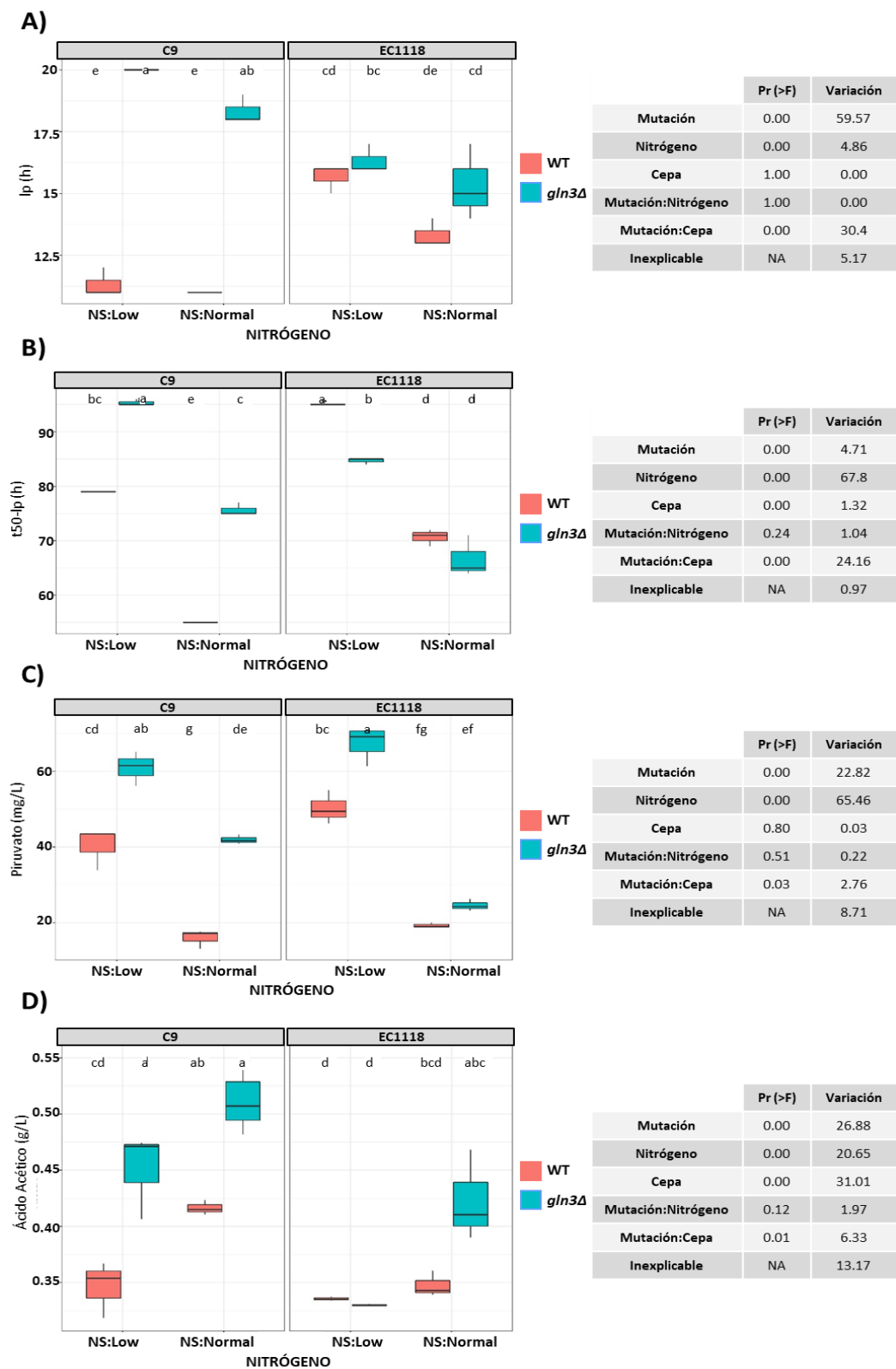
Los resultados muestran diferentes fenotipos en los mutantes *gln3Δ*. Mientras que en C9, *GLN3* parece ser necesario para llevar a cabo una correcta fermentación, en el caso de EC1118 parece ser al contrario, su delección causa una mejora en la capacidad fermentativa. Estos resultados, junto con la mayor tolerancia en presencia de 2DG y GlcN observada en la Figura 92, sugieren que la cepa EC1118 presenta una regulación por nutrientes diferente, no solo frente a la fuente de carbono sino también frente a la represión catabólica por nitrógeno.



**Figura 93.** Efecto de la agitación en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vinificación en mosto Sauvignon Blanc conducida por mutantes *gln3Δ* en las cepas C9 y EC1118. Fase de latencia (*Ip*) (A). Tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos el tiempo de la fase de latencia (*t50-Ip*) (B). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido en condiciones de nitrógeno adecuado (Normal) en no agitación (NS, *Not Shaken*, NS:Normal) y agitación (S, *Shaken*, S:Normal). NA: no disponible (*Not Available*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

En la Figura 94 se muestran los fenotipos de los mismos mutantes *gln3Δ* en condiciones de vinificación con un mosto deficiente en nitrógeno (NS:Low), comparados con los obtenidos en condiciones de concentración normal de nitrógeno (NS:Normal). En el panel A se observa que la mayor parte de la variación observada en la fase de latencia (59.57 %) se debe a la delección del gen *GLN3* y no a las condiciones o cepas analizadas. El mutante C9 *gln3Δ* presenta una extensión de la fase de latencia de manera estadísticamente significativa (diferentes letras) respecto de su cepa silvestre, tanto con concentración de nitrógeno baja como normal. Sin embargo, el mutante EC1118 *gln3Δ* presenta una fase de latencia similar a su cepa silvestre. Es

destacable que tanto los mutantes como las cepas silvestres parecen percibir la disponibilidad limitada de nitrógeno y muestran fases de latencia más largas en esas condiciones, a pesar de que al principio hay nitrógeno disponible para arrancar la fermentación. En el panel B se muestra el tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> (t50-lp), donde la concentración de nitrógeno explica el 67.8 % de la variación observada. En este caso, el mutante C9 *gln3Δ* presenta una menor eficiencia fermentativa (mayor t50-lp) tanto en NS:Low como en NS:Normal. El t50-lp en la condición NS:Low, tanto del mutante *gln3Δ* como de la cepa silvestre, es mayor que la correspondiente en la condición NS:Normal, tal y como era de esperar al realizar la fermentación con una concentración de nitrógeno baja. Sin embargo, la delección del gen *GLN3* en la cepa EC1118 parece mejorar su capacidad fermentativa de forma estadísticamente significativa, particularmente en condiciones de baja concentración de nitrógeno. La acumulación de piruvato se muestra en el panel C de la Figura 94. Al igual que para el parámetro t50-lp, las diferencias observadas en la concentración de piruvato se deben en mayor parte a la concentración de nitrógeno (65.46 %). En todas las condiciones analizadas la delección del gen *GLN3* aumenta la concentración de piruvato, siendo más acusada dicha diferencia respecto de la respectiva cepa silvestre en la cepa C9. Respecto al ácido acético (panel D), el efecto tanto de la mutación como de la concentración de nitrógeno y la cepa es muy similar (26.88, 20.65 y 31.01 respectivamente). La única diferencia estadísticamente significativa que se observa entre la cepa silvestre y su respectivo mutante *gln3Δ* es en la condición NS:Low y la cepa C9. No se observan diferencias en la concentración de glicerol o ácido málico en los mutantes *gln3Δ* respecto a su cepa silvestre (datos no mostrados).



**Figura 94.** Efecto del nitrógeno en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vinificación en mosto Sauvignon Blanc conducida por los mutantes de delección de *GLN3* en las cepas C9 y EC1118. Fase de latencia ( $I_p$ ) (A), tiempo de producción del 50 % de  $\text{CO}_2$  menos la fase de latencia ( $t_{50-I_p}$ ) (B), piruvato (mg/L) (C) y ácido acético (g/L) (D). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido

en estático (*Not Shaken*, NS): concentración adecuada de nitrógeno (Normal) o baja concentración de nitrógeno (Low). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

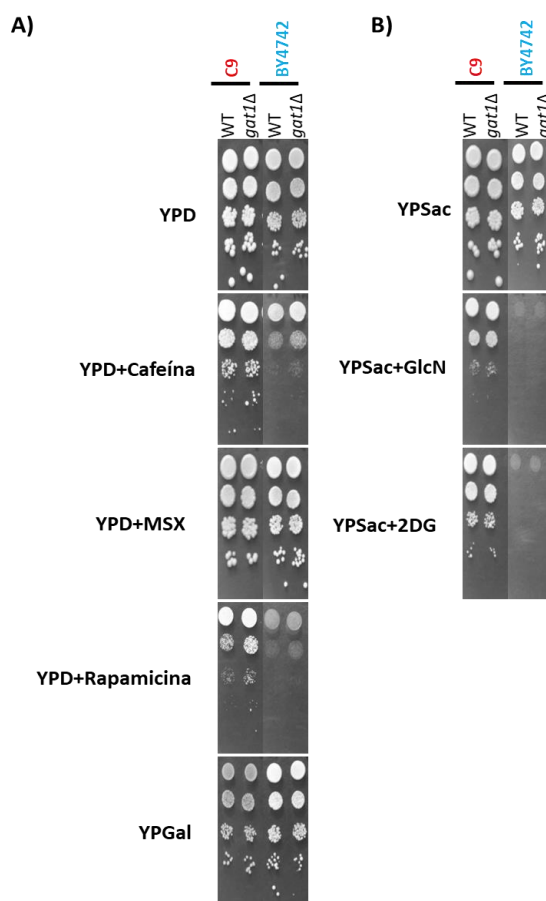
La ausencia de crecimiento en presencia de glicerol del mutante EC1118 *gln3Δ* y el crecimiento de los mutantes *gln3Δ* en las cepas vínicas C9 y QA23 (Figura 92 panel B) sugieren que la cepa EC1118 presenta una regulación diferente de la NCR posiblemente relacionada con las mitocondrias. Se necesitarían experimentos adicionales para determinar si el mutante EC1118 *gln3Δ* presenta mitocondrias funcionales. La diferencia fenotípica entre EC1118 *gln3Δ* y C9 *gln3Δ* también queda plasmada en las condiciones de vinificación analizadas (Figura 93 y Figura 94). Gln3p es un activador transcripcional de genes regulados por la represión catabólica por nitrógeno y su delección conduce a un aumento de la resistencia a estrés oxidativo aunque la levadura crece fermentativamente en condiciones de vinificación. Como consecuencia, en condiciones de agitación (S:Normal) es de esperar un efecto positivo debido al aumento del estrés oxidativo mientras que en condiciones de bajo nitrógeno (NS:Low) un efecto negativo debido a la delección del gen *GLN3*. La delección del gen *GLN3* aumenta la fase de latencia en todas las condiciones analizadas (panel A de las Figura 93 y Figura 94) mostrando la implicación de Gln3p en la adaptación al medio de vinificación. La disminución del parámetro t50-lp en el mutante EC1118 *gln3Δ* en todas las condiciones analizadas (panel B de las Figura 93 y Figura 94) sugiere que Gln3p, además de estar implicada en la fase de latencia, también lo está en la fase estacionaria y confirma de nuevo que la regulación de la NCR es diferente en la cepa EC1118.

## 2.2. Estudio del papel del activador transcripcional *GAT1* en diversas cepas

### 2.2.1. Análisis de la tolerancia frente a diversos inhibidores químicos

Para completar el análisis del papel de la represión catabólica por nitrógeno en cepas vínicas y de laboratorio se amplió el estudio a la proteína Gat1p, segundo activador transcripcional implicado, mucho menos caracterizado, que junto a Gln3p regulan la NCR. Para ello, se construyeron mutantes de delección en dicho gen en los fondos genéticos C9 y BY4742.

El fenotipo de crecimiento de los mutantes *gat1Δ* se analizó mediante goteos en placa frente a diversos inhibidores químicos, tanto relacionados con el metabolismo del nitrógeno como con la represión catabólica por glucosa, Figura 95. A diferencia de los resultados obtenidos en el apartado 2.1.1 de este capítulo, donde se observaban diferencias de tolerancia del mutante *gln3Δ* en función de la cepa, los mutantes *gat1Δ*, independientemente de la cepa donde se hayan construido los mutantes, no presentan fenotipo diferencial respecto de su cepa silvestre, lo que refuerza la idea de su menor contribución, que puede ser suplida por la presencia de una copia funcional de Gln3p en la mayoría de las condiciones. La única excepción es la resistencia a rapamicina, que aumenta en un mutante *gat1Δ* en la cepa C9 pero no en la cepa BY4742. La cepa de laboratorio BY4742 es más sensible que la C9 a los inhibidores que provocan represión por glucosa (panel B), pero la delección de *GAT1* no tiene efecto en ninguna de ellas, a diferencia de lo observado para *GLN3*.

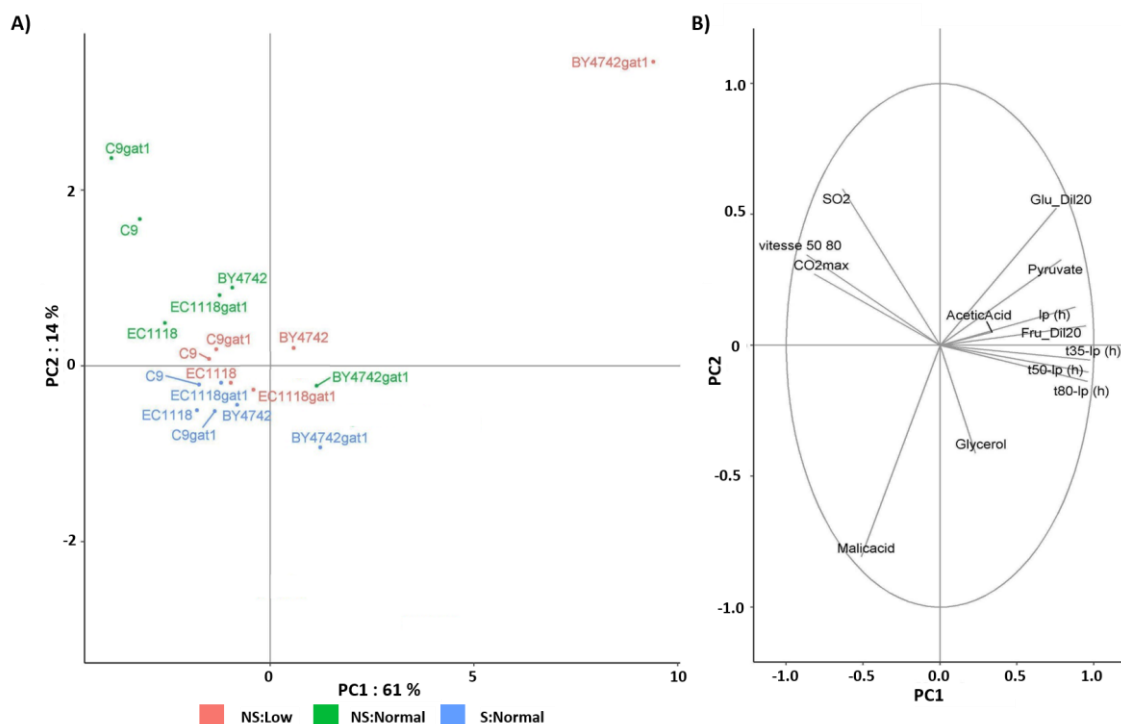


**Figura 95.** Análisis fenotípico de los mutantes *gat1Δ* en los fondos genéticos C9 y BY4742. Crecimiento de las cepas indicadas en medio completo YPD en presencia de cafeína (10 mM), L-metionina sulfoximina (MSX, 1 mM) y rapamicina (100 nM). También se realizan los goteos en presencia de galactosa (YPGal) como única fuente de carbono (**A**). Goteos de las cepas indicadas en medio con sacarosa como fuente de carbono en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200  $\mu$ g/mL) (**B**). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica. WT: Wild Type.

### 2.2.2. Análisis fenómico del mutante *gat1Δ* en condiciones de vinificación

Los mutantes *gat1Δ* se analizaron en condiciones de vinificación, incluyendo también en este caso el construido en la cepa vínica diploide EC1118. El análisis de componentes principales (PCA) (panel A), junto con el círculo de correlación (panel B) de los parámetros medidos a lo largo de la vinificación, se muestran en la Figura 96. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S: *Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos ( $l_p$ ,  $t_{35/50/80-l_p}$ ,  $v_{50\_80}$ ) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el  $SO_2$ , la glucosa y la fructosa. En el PCA (Figura 96 panel A) puede observarse la agrupación de las cepas analizadas en función de las condiciones consideradas y parámetros determinados. En este caso, ambos componentes principales permiten agrupar el 75 % de la variación

observada. Bajo la condición NS:Normal (color verde), puede observarse cierta agrupación de las cepas vínicas (C9 y EC1118) y una separación del mutante *gat1Δ*. También puede observarse que, como consecuencia de la baja capacidad fermentativa, el mutante BY4742 *gat1Δ* en NS:Low (color rojo) se encuentra aislado del resto de cepas analizadas en el PCA indicando que todos sus parámetros difieren respecto a las demás cepas; sobre todo la glucosa y la fructosa residual ya que no es capaz de finalizar la fermentación. Todas las demás cepas de laboratorio analizadas son capaces de finalizar la fermentación, presentando mayores dificultades en condiciones de bajo nitrógeno. Respecto al círculo de correlación (Figura 96 panel B), la agrupación de los parámetros es diferente de la observada anteriormente (Figura 86) con piruvato y ácido acético muy similares, sin relación con el glicerol (ángulo de 90 °).

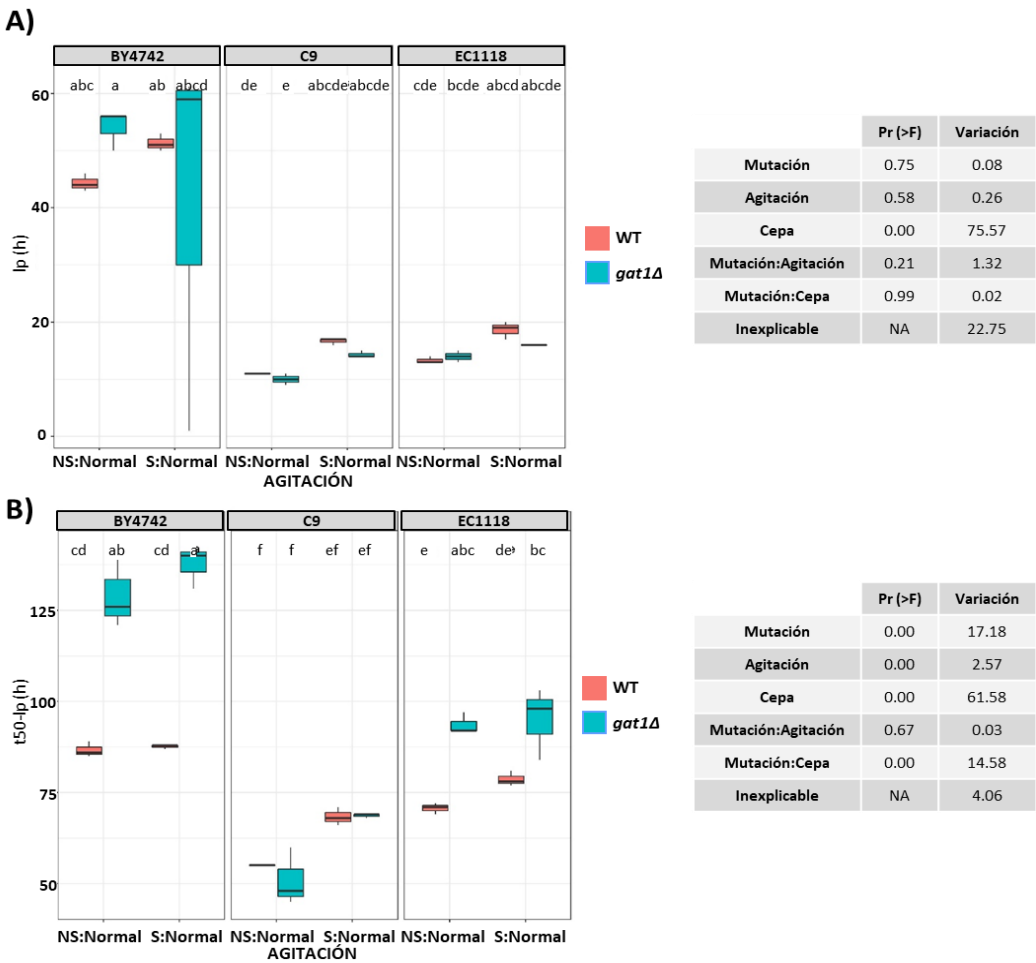


**Figura 96.** Análisis fenómico del mutante *gat1Δ* en diferentes fondos genéticos en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de los mutantes de delección y sus respectivas cepas silvestres (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (Ip), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta Ip (t35/50/80-Ip), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_Dil20 y Fru\_Dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

En la Figura 97 se muestra el efecto de la agitación en los parámetros cinéticos y enológicos en los mutantes *gat1Δ* en los fondos genéticos BY4742, EC1118 y C9. Se ha optado por una representación mediante diagrama de cajas para comparar las diferencias fenotípicas de la delección de *GAT1* en función de la cepa donde se ha construido (BY4742, C9 o EC1118). La tabla muestra el porcentaje de la variación que se explica debido a la mutación (delección del

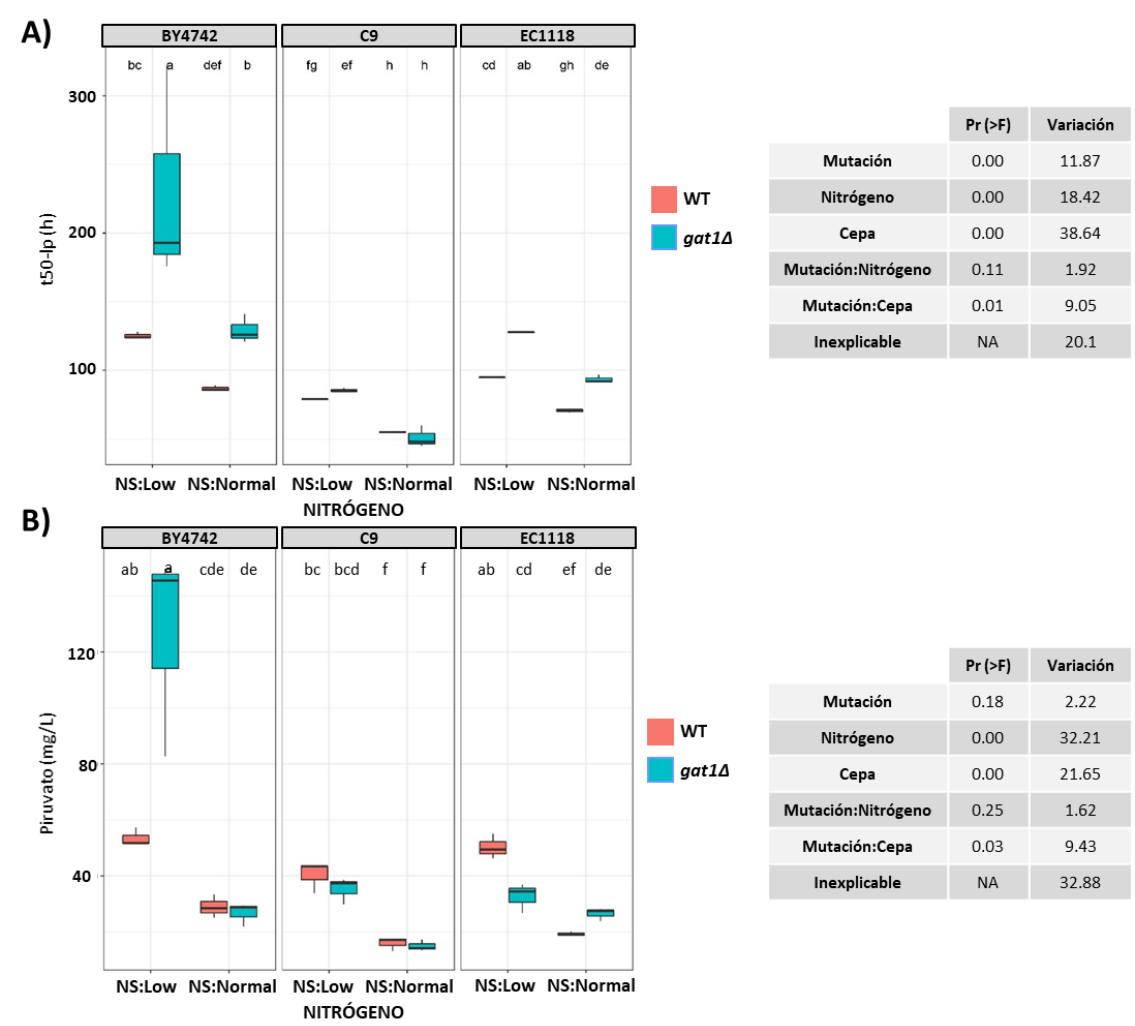


gen), la agitación, la cepa y la relación entre la mutación y la agitación o entre la mutación y la cepa. Tal y como era de esperar de una cepa de laboratorio, la fase de latencia es mayor tanto en BY4742 como en su respectivo mutante *gat1Δ* (panel A). No hay diferencias estadísticamente significativas en las demás fases de latencia en las dos condiciones analizadas: agitación y estático. La diferencia observada en la fase de latencia entre la cepa de laboratorio y la cepa vínica engloba el 75.57 % de la variación observada. Respecto al tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-lp) (panel B), los mutantes *gat1Δ* presentan un t50-lp mayor, a excepción de C9 *gat1Δ* que se comporta igual que su respectiva cepa silvestre. No hay diferencias estadísticamente significativas en los metabolitos de interés enológico (datos no mostrados), indicando que el gen *GAT1* no es esencial durante la vinificación en concentraciones de nitrógeno adecuadas, y que, como se ha comentado anteriormente, Gln3p puede estar supliendo parcialmente la delección de *GAT1*.



**Figura 97.** Efecto de la agitación en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vinificación en mosto Sauvignon Blanc conducida por mutantes *gat1Δ* en los fondos genéticos BY4742, C9 y EC1118. Fase de latencia (lp) (A) y tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos el tiempo de la fase de latencia (B). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal) y agitación nitrógeno normal (S:Normal). NA: no disponible (*Not Available*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

En la Figura 98 se muestran los parámetros destacables en base a los fenotipos observados en los mutantes *gat1Δ* en función de la disponibilidad de nitrógeno (condiciones NS:Normal y NS:Low). No se observan diferencias entre los mutantes *gat1Δ* y sus respectivas cepas silvestres en la fase de latencia en función de las condiciones de nitrógeno analizadas (datos no mostrados). El tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> sin tener en cuenta la fase de latencia (t50-lp, panel A) es superior en la cepa de laboratorio BY4742 como cabía esperar, de ahí que el 38.64 % de la variación se deba a la cepa. Respecto a los mutantes de delección, únicamente aquellos construidos en las cepas BY4742 *gat1Δ* en baja concentración de nitrógeno y EC1118 *gat1Δ* en concentración normal de nitrógeno muestran diferencias estadísticamente significativas. La deficiencia de nitrógeno incrementa el t50-lp en todos los mutantes de delección, a excepción de C9 *gat1Δ*. La única diferencia estadísticamente significativa en la concentración de piruvato (panel B) entre las cepas silvestres y sus correspondientes mutantes *gat1Δ* se observa en condiciones de bajo nitrógeno, donde el mutante EC1118 *gat1Δ* presenta una concentración menor. Respecto a este parámetro, únicamente el 32.21 % de la variación se debe a la concentración de nitrógeno, porcentaje muy similar a la variación debida al azar (32.88 %). La producción de ácido acético presenta la misma tendencia que la del piruvato (datos no mostrados), tal y como demuestra la agrupación observada en el PCA (Figura 96 panel B). Estos resultados sugieren que *GAT1* no es necesario para la adaptación al mosto pero sí está implicado en la capacidad fermentativa ya que los mutantes *gat1Δ* presentan un mayor t50-lp y, por tanto, una menor velocidad de fermentación en EC1118.



**Figura 98.** Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vivificación en mosto Sauvignon Blanc con mutantes *gat1Δ* en los fondos genéticos BY4742, C9 y EC1118. Tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos el tiempo de la fase de latencia (t50-lp) (A) y piruvato (mg/L) (B). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido en no agitación: concentración adecuada de nitrógeno (Normal) o baja concentración de nitrógeno (Low). NA: no disponible (*Not Available*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

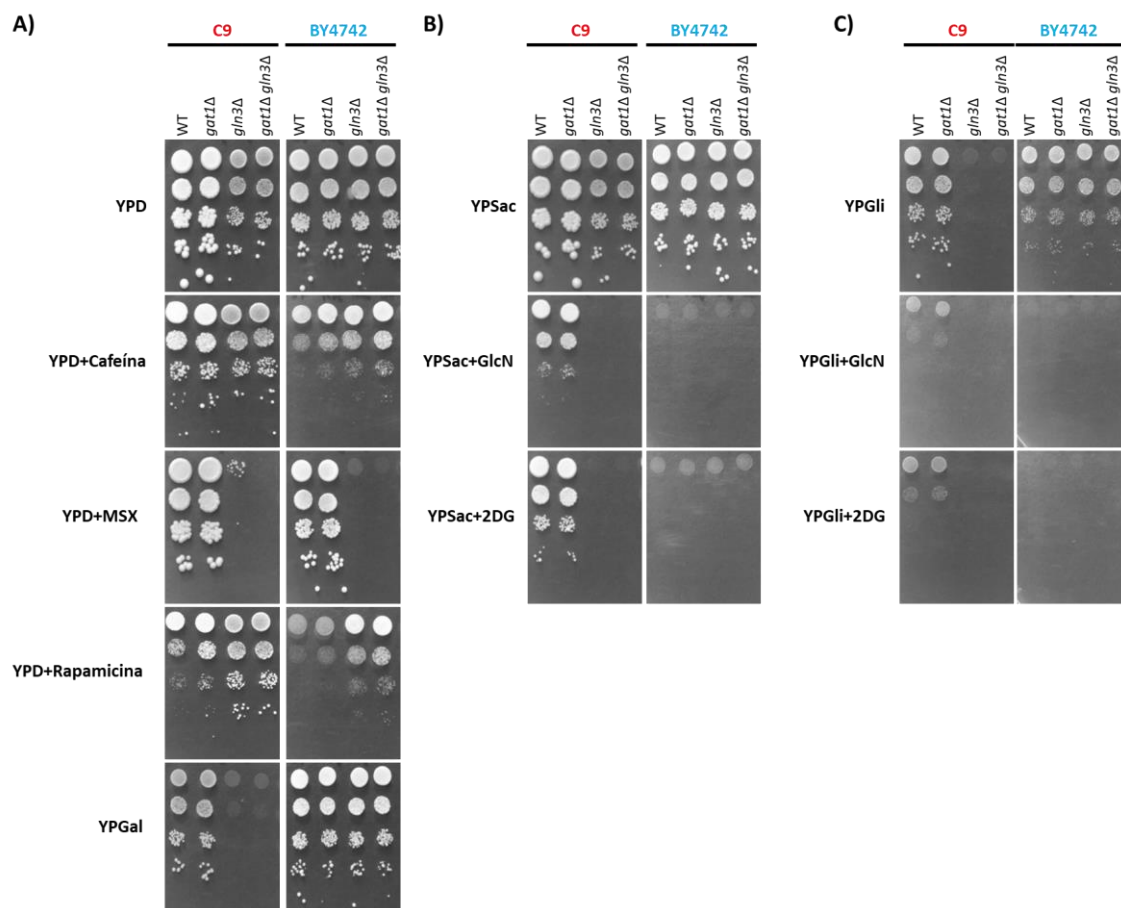
2.3. Análisis de la interacción entre Gat1p y Gln3p en diversas cepas

2.3.1. Análisis de la tolerancia frente a diversos inhibidores químicos

Debido a las diferencias observadas en el fenotipo de los mutantes *gln3Δ*, se procedió a construir dobles mutantes de delección en la cepa vínica C9 y en la cepa de laboratorio BY4742, eliminando también el gen *GAT1* con el objetivo de analizar la interacción entre ambos factores transcripcionales. El fenotipo de crecimiento de las cepas se analizó mediante goteos en placa en presencia de inhibidores químicos relacionados con la síntesis de aminoácidos, fuentes de carbono respirables o análogos estructurales de la glucosa, Figura 99.

Tal y como se observó en el apartado 2.1.1, el mutante C9 *gln3Δ* no es capaz de respirar por lo que su crecimiento en presencia de glicerol o galactosa como fuente de carbono es nulo. Sin

embargo, el mutante BY4742 *gln3Δ* no presenta ningún déficit de crecimiento en dichos medios (Figura 99 paneles B y C). Respecto al mutante de delección *gat1Δ*, los fenotipos observados respecto a la cafeína y la rapamicina (panel A) se deben a la cepa ya que la C9 es más resistente a dichos inhibidores que la cepa BY4742. Teniendo en cuenta los fenotipos observados para los mutantes de delección simple y la cepa donde se han construido, puede observarse que el fenotipo de los mutantes dobles *gat1Δgln3Δ* es igual que el fenotipo del mutante simple *gln3Δ* correspondiente. Por ejemplo, el mutante *gln3Δ* no es capaz de crecer en presencia de L-metionina sulfoximina ni en la cepa C9 ni en la BY4742, al igual que sus respectivos mutantes dobles. Por otro lado, BY4742 *gln3Δ* es capaz de crecer en presencia de galactosa (panel A) al igual que BY4742 *gat1Δgln3Δ*.



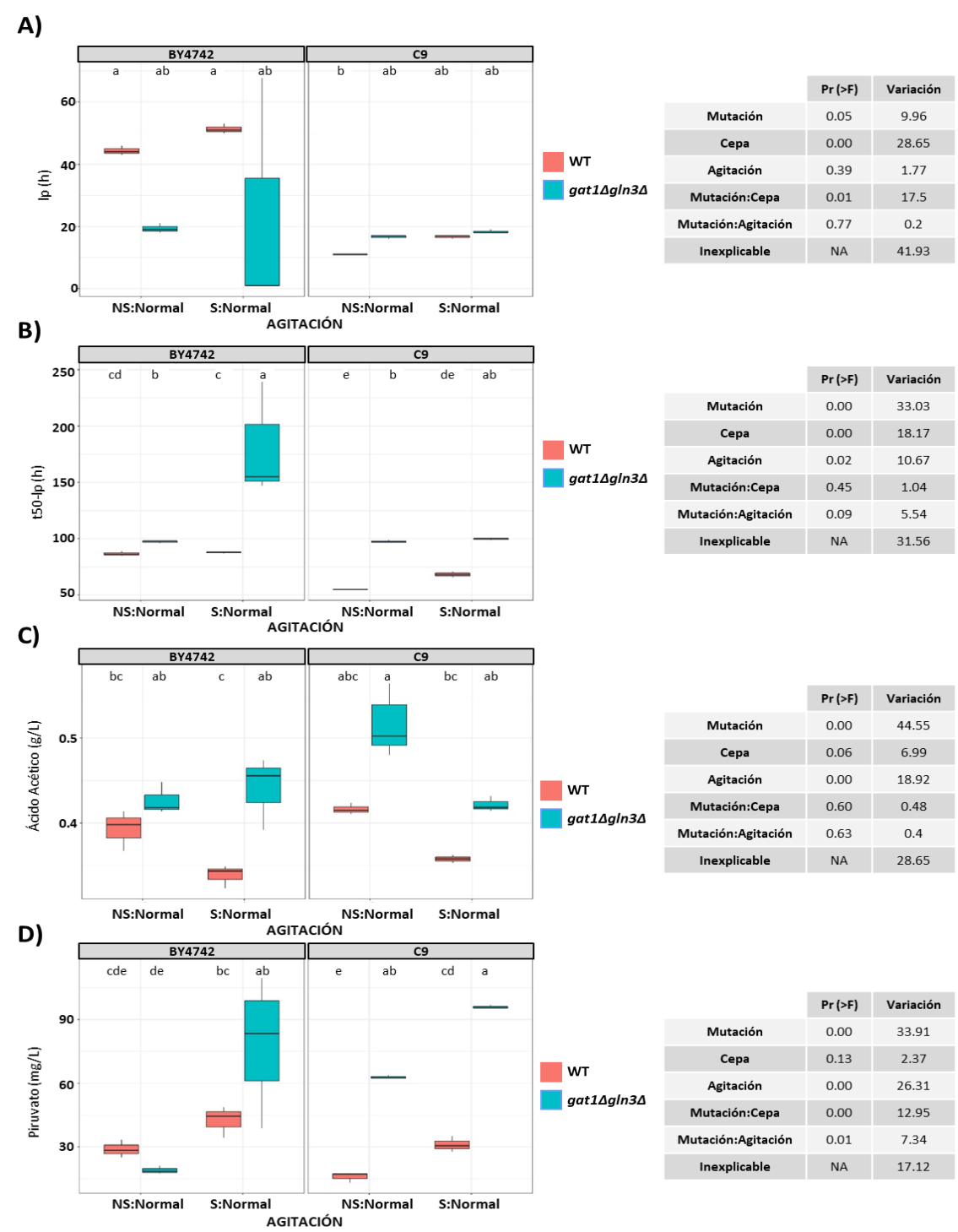
**Figura 99.** Análisis de crecimiento en presencia de diversos inhibidores químicos y fuentes de carbono de los mutantes *gat1Δ*, *gln3Δ* y *gat1Δgln3Δ* en los fondos genéticos C9 y BY4742. Goteos en medio completo YPD en presencia de cafeína (10 mM), L-metionina sulfoximina (MSX, 1 mM) y rapamicina (100 nM). También se realizan los goteos en presencia de galactosa (YPGal) como única fuente de carbono (A). Goteos en medio completo con sacarosa (YPSac) (B) o glicerol (YPGli) (C) como fuente de carbono en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 200 μg/mL). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica. WT: cepa silvestre (*Wild Type*).

Aunque el fenotipo observado para *gln3Δ* depende de la cepa donde se ha construido el mutante de delección, el doble mutante *gat1Δgln3Δ* presenta el mismo fenotipo que el mutante *gln3Δ* sugiriendo que, aunque la función de *GLN3* varíe dependiendo de la cepa, la regulación entre los activadores transcripcionales tipo GATA es la misma en las dos cepas analizadas. Estos resultados sugieren que Gat1p no tiene un papel adicional a Gln3p en las condiciones analizadas y podría estar controlado por Gln3p, como ha sido descrito en condiciones de laboratorio (Cooper, 2002).

### 2.3.2. Análisis fenómico del mutante *gat1Δgln3Δ* en condiciones de vinificación

Para completar el estudio de la interacción entre los factores transcripcionales codificados por los genes *GAT1* y *GLN3* en función de la cepa C9 o BY4742, se llevó a cabo un análisis fenómico de los dobles mutantes *gat1Δgln3Δ*. Se utilizaron dos cepas haploides para facilitar la construcción del doble mutante. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:*Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos (Ip, t35/50/80-Ip, v50\_80) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa.

Al igual que en los apartados anteriores, los resultados se han mostrado en forma de diagramas de cajas indicando en la tabla correspondiente la variación debida a la mutación, a la cepa, a la agitación o a la relación entre la mutación y la cepa o la agitación. En primer lugar, se analizó la influencia de la agitación y, por tanto, la mayor presencia de oxígeno, en los parámetros cinéticos y enológicos, Figura 100. La doble delección de *GLN3* y *GAT1* en la cepa BY4742 en condiciones de no agitación (NS:Normal) disminuye la fase de latencia (Ip, Figura 100 panel A). En condiciones de agitación, el error experimental no permite discernir si también se observa una reducción de la Ip. Mientras que las delecciones simples *gat1Δ* y *gln3Δ* o no afectan a la fase de latencia o la aumentan (paneles A de las Figura 93, Figura 94 y Figura 97), la delección conjunta de *GLN3* y *GAT1* reduce la fase de latencia en la cepa BY4742 en condiciones de no agitación y nitrógeno adecuado (NS:Normal). Respecto al mutante C9, se observa el efecto opuesto, un ligero aumento de la Ip en las dos condiciones analizadas. Es destacable que la cepa BY4742 *gat1Δgln3Δ*, a pesar de presentar una menor fase de latencia, muestra un mayor tiempo de liberación del 50 % de CO<sub>2</sub> (t50-Ip, Figura 100 panel B). Estos resultados sugieren que, aunque la delección de los genes de ambos factores transcripcionales puede favorecer la adaptación al mosto, tiene también consecuencias negativas para la eficiencia fermentativa impidiendo la correcta progresión de la fermentación. Se observa una mayor acumulación de ácido acético (panel C) en el doble mutante BY4742 *gat1Δgln3Δ* en condiciones de agitación que no se observa en las demás cepas estudiadas. La mayor acumulación de piruvato (Figura 100 panel D) se produce independientemente de la condición de agitación analizada en la cepa C9, pero no en el fondo BY4742. No hay diferencias ni en la glucosa ni en la fructosa residual, por lo que la mayor acumulación de ácido acético debe ser a expensas de otros metabolitos, como por ejemplo, la disminución de etanol. La determinación del etanol al finalizar la fermentación, la cual no pudo realizarse, hubiera sido de gran interés para obtener una visualización más completa del fenotipo de los mutantes de delección analizados.



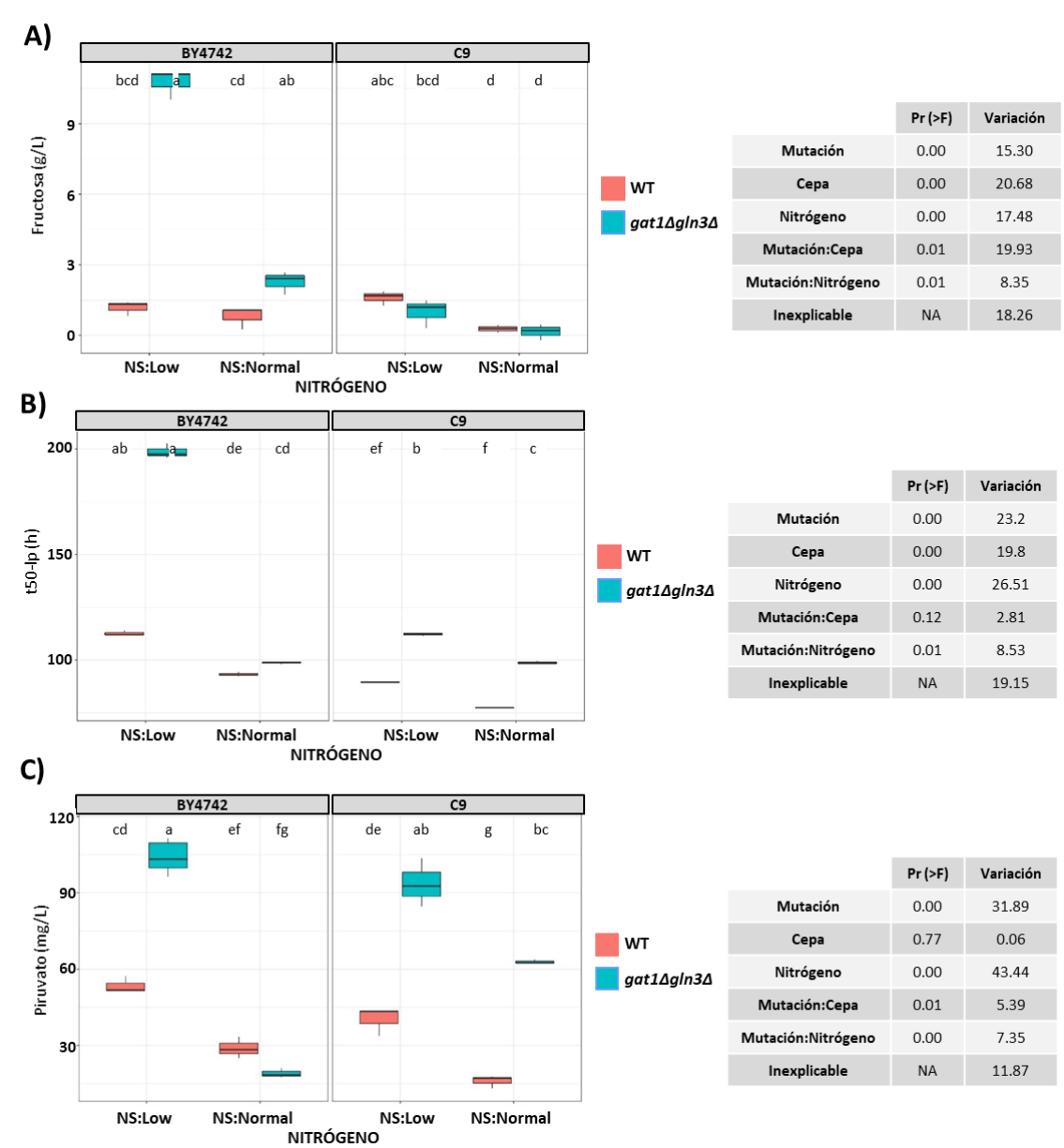
**Figura 100.** Efecto de la agitación en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vinificación en mosto Sauvignon Blanc del doble mutante *gat1Δgln3Δ* en los fondos genéticos BY4742 y C9. Fase de latencia ( $I_p$ , h) (A), tiempo para liberar el 50 % de  $\text{CO}_2$  menos la fase de latencia ( $t_{50-I_p}$ , h) (B), ácido acético (g/L) (C) y piruvato (mg/L) (D). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido en no agitación: concentración adecuada de nitrógeno (Normal) o baja concentración de nitrógeno (Low). NA: no disponible (*Not Available*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

A continuación, se analizaron los resultados obtenidos de las vinificaciones realizadas en estático con el mosto suplementado (NS:Normal) o con déficit de nitrógeno (NS:Low), Figura 101. En condiciones de nitrógeno bajo (NS:Low), el doble mutante BY4742 *gat1Δgln3Δ* presenta una elevada fase de latencia (113 horas) en deficiencia de nitrógeno, más del doble que su respectiva cepa silvestre BY4742 (46.7 horas), mientras que en NS:Normal la fase de latencia de BY4742 *gat1Δgln3Δ* (19.3 horas) se ve reducida a la mitad respecto del silvestre (44.26 horas) (datos no mostrados). A pesar de esa extensión en la fase de latencia, fue capaz de iniciar la fermentación aunque con capacidad fermentativa reducida (Figura 101 panel B) y consumir prácticamente toda la glucosa (1.59 g/L de glucosa residual) pero no la fructosa (10.74 g/L fructosa residual) (panel A) del mosto de uva tanto en NS:Normal como en NS:Low.

Respecto la cepa C9, el doble mutante también aumenta su *l<sub>p</sub>* aunque de manera similar en ambas condiciones de disponibilidad de nitrógeno (datos no mostrados). En los fondos genéticos analizados, el doble mutante presenta un mayor tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la *l<sub>p</sub>* (*t*<sub>50-*l<sub>p</sub>*</sub>, Figura 101 panel B), indicando que los activadores transcripcionales son importantes durante la vinificación independientemente de la concentración de oxígeno o nitrógeno presente en el mosto. Respecto al piruvato (panel C), se observa cierta acumulación en el doble mutante, igual que en condiciones de agitación (panel D). No se observan diferencias en la concentración de ácido acético ni entre los dobles mutantes de delección ni entre las condiciones analizadas (datos no mostrados).

Mientras que la delección de *GAT1* no influye en la *l<sub>p</sub>*, la delección de *GLN3* la aumenta. Por lo tanto, igual que en los resultados de fenotipo de crecimiento obtenidos en los goteos realizados frente a diversos inhibidores, el doble mutante es muy similar al mutante *gln3Δ*, lo que sugiere que, en condiciones de vinificación, Gln3p actúa por encima de Gat1p. *A priori*, en condiciones de deficiencia de nitrógeno cabría esperar fenotipos adicionales en el doble mutante ya que Gat1p y Gln3p presentan funciones específicas (Scherens et al., 2006), además de funciones redundantes.

De especial mención es que la eliminación de ambos activadores transcripcionales que regulan la NCR causa una mejor adaptación a las condiciones de vinificación (NS:Normal)(menor *l<sub>p</sub>*) en la cepa BY4742, en condiciones de no agitación y concentración normal de nitrógeno, pero no en la cepa vínica C9 (Figura 100 panel A). Esta diferencia de fenotipo en función de la cepa sugiere una regulación diferencial de la NCR que podría ser consecuencia de la adaptación de las cepas vínicas al crecimiento en mostos de uva, medios con cierta riqueza en aminoácidos. Esta hipótesis es también consistente con los fenotipos de crecimiento observados mediante goteos en placa frente a inhibidores de la síntesis de aminoácidos como el aminotriazol (Figura 90).



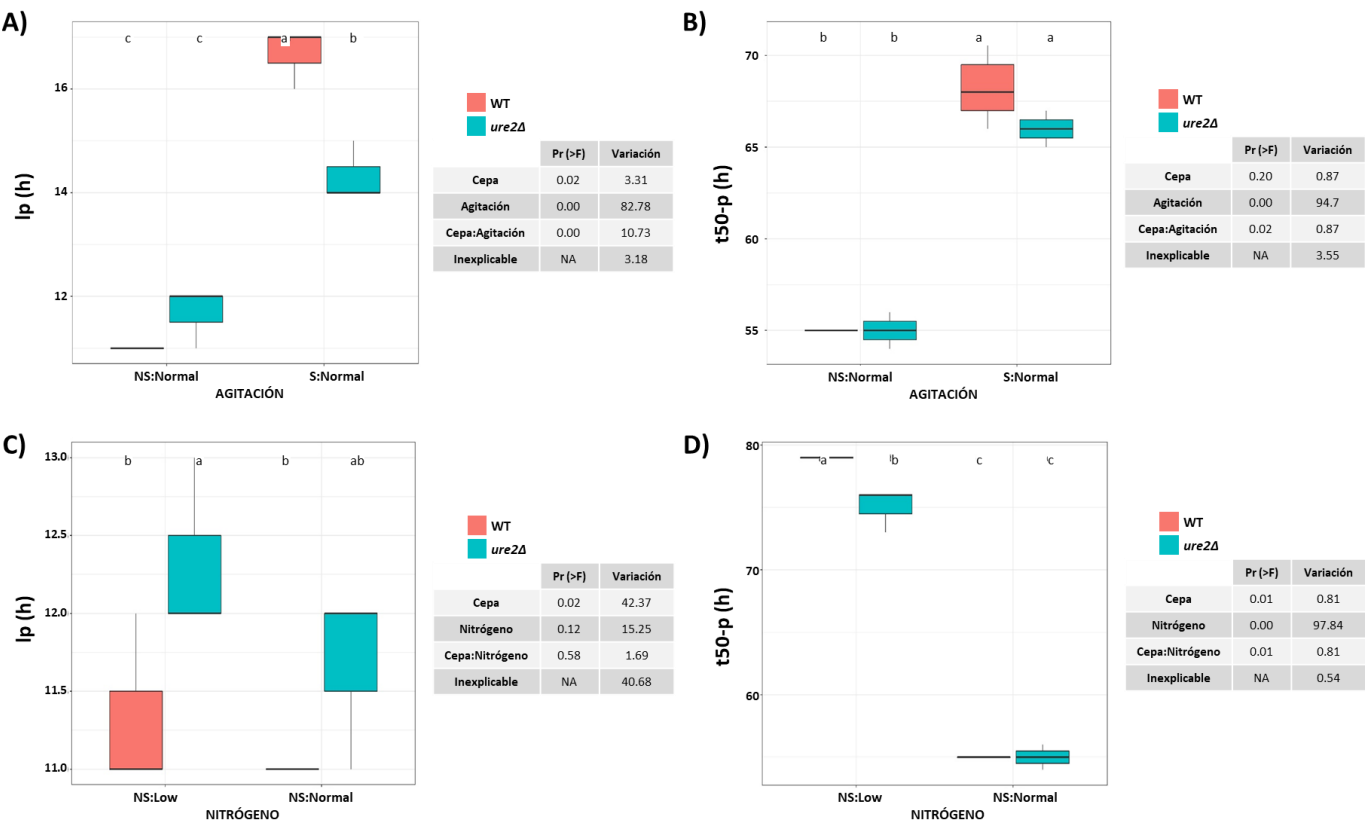
**Figura 101.** Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en los parámetros cinéticos y enológicos durante la vinificación en mosto Sauvignon Blanc en el doble mutante *gat1Δgln3Δ* en los fondos genéticos BY4742 y C9. Fructosa residual total medida a partir de una dilución 1:20 de la muestra (A), tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos el tiempo de la fase de latencia (t50-lp) (A), piruvato (g/L) (B). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos. Las condiciones analizadas han sido en no agitación: concentración adecuada de nitrógeno (Normal) o baja concentración de nitrógeno (Low). NA: no disponible (*Not Available*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

Dado que la actividad de Gln3p y Gat1p como activadores transcripcionales está regulada por el represor transcripcional codificado por el gen *URE2*, que los mantiene en el citoplasma en condiciones de represión por catabolito de nitrógeno (Cox et al., 2000), se analizó el fenotipo del mutante C9 *ure2Δ* en el que Gat1p y Gln3p se encuentran activos. Como en los apartados anteriores se realizó una vinificación en mosto Sauvignon Blanc donde las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno



normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:*Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos (Ip, t35/50/80-Ip, v50\_80) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa. El fenotipo del mutante de delección *ure2Δ* y la cepa silvestre se muestran en la Figura 102.

En condiciones de agitación (S:Normal), la delección del gen *URE2* causa una reducción de la fase de latencia (panel A), aunque el tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> (t50-Ip)(panel B) es muy similar a la cepa silvestre. Sin embargo, el 94.7 % de la variación observada, tal y como se muestra en la tabla del panel B de la Figura 102, se debe a las condiciones de agitación puesto que, tanto la fase de latencia como el t50-Ip son muy diferentes entre las condiciones NS:Normal y S:Normal, tal y como se observó incluso para la cepa C9 (Figura 20 panel A y B). Aun así, puede apreciarse una reducción en la fase de latencia (estadísticamente significativa) en el mutante de delección. La delección del gen *URE2* no modifica en condiciones NS:Normal ni la fase de latencia ni el t50-Ip (Figura 102 panel A). Cuando la concentración de nitrógeno es baja (paneles C y D), la fase de latencia aumenta y la capacidad fermentativa se ve reducida. Estos resultados indican que la activación permanente de Gat1p y Gln3p afecta negativamente a la vinificación si la concentración de nitrógeno es baja, pero no cuando es adecuada, quizás porque la estimulación temprana de los mecanismos silenciados por la NCR limita más efectivamente el transporte de alta afinidad de compuestos nitrogenados que el de baja afinidad, aspecto que podría investigarse. Por otra parte, estos resultados están en contraposición con los obtenidos por Deed et al., (2011), donde un mutante *ure2Δ* en la cepa vínica M2 presentó un ligero retraso en la fase de latencia en condiciones de vinificación con agitación (100 rpm). Esta diferencia observada en el fenotipo de un mismo mutante de delección en función de la cepa vuelve a dejar patente una diferente regulación de la NCR en diferentes cepas vínicas.



**Figura 102.** Análisis de la delección del gen *URE2* en los parámetros cinéticos en la fermentación alcohólica del mosto Sauvignon Blanc. Fase de latencia ( $I_p$ , h) (A) y tiempo en liberar el 50 % de  $\text{CO}_2$  menos la fase de latencia ( $t_{50-p}$ , h) (B) en condiciones de agitación del mutante *ure2Δ* y su respectiva cepa silvestre C9. Fase de latencia ( $I_p$ , h) (C) y tiempo en liberar el 50 % de  $\text{CO}_2$  menos la fase de latencia ( $t_{50-p}$ , h) (D) en condiciones de nitrógeno del mutante *ure2Δ* y su respectiva cepa silvestre C9. Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

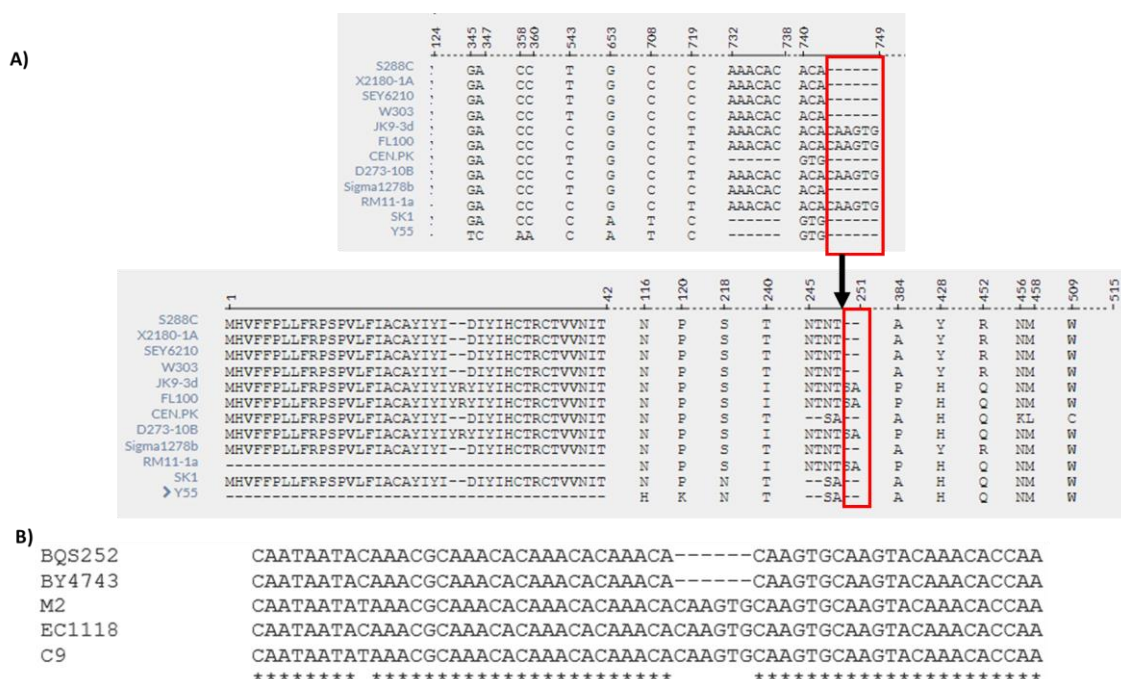
A lo largo del apartado 2 se han analizado los genes *GAT1* y *GLN3* a través de sus mutantes de delección y su implicación en función de la cepa. Para ello se han realizado goteos en placa frente a diversos inhibidores o realizado vinificaciones que han permitido llevar a cabo un análisis fenómico de las cepas analizadas. Aunque los goteos no mostraron diferencias de crecimiento de los mutantes *gat1Δ* respecto de sus cepas silvestres, los mutantes *gln3Δ* sí que mostraron una amplia variabilidad de fenotipo. A destacar el crecimiento de EC1118 *gln3Δ* en presencia de fuentes de carbono no fermentables y la mayor resistencia a AT de la cepa C9 *gln3Δ*. Esa elevada diversidad de fenotipo de los mutantes *gln3Δ* en función de la cepa donde se construyeron sugiere que, aunque la NCR es un mecanismo ampliamente estudiado, su regulación varía de una cepa a otra. Sin embargo, los estudios del estado de fosforilación de Gln3 en vinificación presentados en el Capítulo 1 (Figura 71) no muestran diferencia alguna en la activación de Gln3p a lo largo del proceso de vinificación entre la cepa de laboratorio BQS252 y la cepa vínica EC1118, lo que sugiere que los fenotipos que se describen en este capítulo pueden estar asociados con alguna de las dianas reguladas por dicho gen.

La reducción de la fase de latencia del doble mutante BY4742 *gat1Δgln3Δ* cuando el nitrógeno está presente en concentraciones adecuadas respecto de las condiciones de baja disponibilidad y el hecho de que no consiga acabar la vinificación (10.74 g/L de fructosa residual) (Figura 101 panel A) podría explicar los resultados obtenidos en el apartado 4.2.3.1 (Figura 71). Los resultados del análisis del estado de fosforilación de Gln3p muestran que se encuentra desfosforilada y, por tanto, activa en las primeras horas de fermentación y que, posteriormente, se fosforila y los niveles de Gln3p van disminuyendo. Esa activación inicial, cuando aparentemente no se dan condiciones de desrepresión ya que la concentración de nitrógeno asimilable por la levadura es elevada, podría conllevar un coste metabólico que, al eliminar Gln3p se traduce en un más rápido arranque de la fermentación. Sin embargo, en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno de partida y después de la fase de latencia, la función de Gln3p es necesaria para poder utilizar otras fuentes de nitrógeno no tan preferidas.

## 2.4. Reemplazamiento del alelo del gen *GAT1*

Gran parte de los estudios realizados sobre los factores transcripcionales tipo GATA se han centrado en el activador Gln3p por ser el único que no está regulado por otro factor transcripcional tipo GATA. Sin embargo, la expresión de *GAT1* es mucho más compleja porque, aunque presenta todos los elementos para ser considerado un gen que responde a la NCR, presenta 5 isoformas con diferente respuesta a la NCR. Rai et al., (2014) demostraron que las distintas isoformas proceden de inicios de traducción alternativos en la ORF de *GAT1*, de manera que se generan formas de Gat1p con inicio de traducción en las metioninas 40, 95 o 102, pero en ningún caso en la metionina 1. Por otra parte, también se ha descrito inicio alternativo de la transcripción de *GAT1* que da lugar a dos proteínas constitutivas que difieren en su N-terminal, mientras que la terminación prematura de la transcripción da lugar a un transcrito muy sensible a represión por catabolito de nitrógeno que aparentemente no se traduce pero podría impedir acumulación excesiva de Gat1p (Georis et al., 2015). Gat1p también sufre procesos de fosforilación en función de la fuente de nitrógeno presente en el medio de crecimiento (Beck y Hall, 1999; Cunningham et al., 2000); sin embargo, dicha fosforilación no se traduce en un cambio en la movilidad electroforética.

Un análisis detallado de las secuencias del gen *GAT1* disponibles en la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) mostró que las cepas industriales presentan una inserción de 6 nucleótidos (CAAGTG) que las cepas de laboratorio no presentaban, Figura 103 panel A. Esa deleción de 6 nucleótidos se traduce en que las cepas de laboratorio presentan una serina y una alanina menos en la secuencia de Gat1p. La deleción afecta a tres codones; sin embargo, el resto de la secuencia (tanto de DNA como de proteína) no se ve modificada, a excepción de la serina y alanina adicionales, ya que la deleción de esos 6 nucleótidos se produce de forma que los nucleótidos en los extremos forman el mismo codón y, por lo tanto, el mismo aminoácido que en la secuencia sin deleción. Para corroborar los datos, se amplificó el gen *GAT1* mediante PCRs de colonia de las cepas de laboratorio BQS252 y BY4743 y de las cepas de vnicas M2, EC1118 y C9. Los resultados se muestran en el panel B de la Figura 103. Esos resultados reafirman la presencia de 6 nucleótidos en las cepas vnicas que dan como resultado una adición de una serina y alanina en las posiciones 250 y 251 (posiciones 744 a 749 de la secuencia nucleotídica). Al ser la serina un aminoácido fosforilable, esta pequeña diferencia podría tener importancia en la función de Gat1p en cepas vnicas a través de la fosforilación de esa serina, ausente en las cepas de laboratorio. Por otra parte, dicha inserción se sitúa inmediatamente detrás del sitio donde se produce el transcrito truncado, así que esta secuencia de 6 nucleotidos adicional podría modular potencialmente este proceso.



**Figura 103.** Diferencias en las secuencias del gen *GAT1* disponibles en *Saccharomyces Genome Database* para las doce cepas mostradas, visualizadas mediante la herramienta “*Variant Viewer*” (A). El cuadro rojo indica el hueco observado en las cepas de laboratorio principalmente que conlleva la pérdida de una serina y una alanina en la secuencia de Gat1p. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger de las cepas de laboratorio BQS252 y BY4743 y de las cepas vínicas M2, EC1118 y C9 utilizando el programa MUSCLE (B).

Debido a algunos fenotipos diferentes observados en las cepas vínicas y en las cepas de laboratorio, como la mayor resistencia a rapamicina o 2-desoxiglucosa, se realizó un reemplazamiento de alelos del gen *GAT1* con el objetivo de determinar si las diferencias de secuencia en dicho gen guardan relación con la diversidad fenotípica observada.

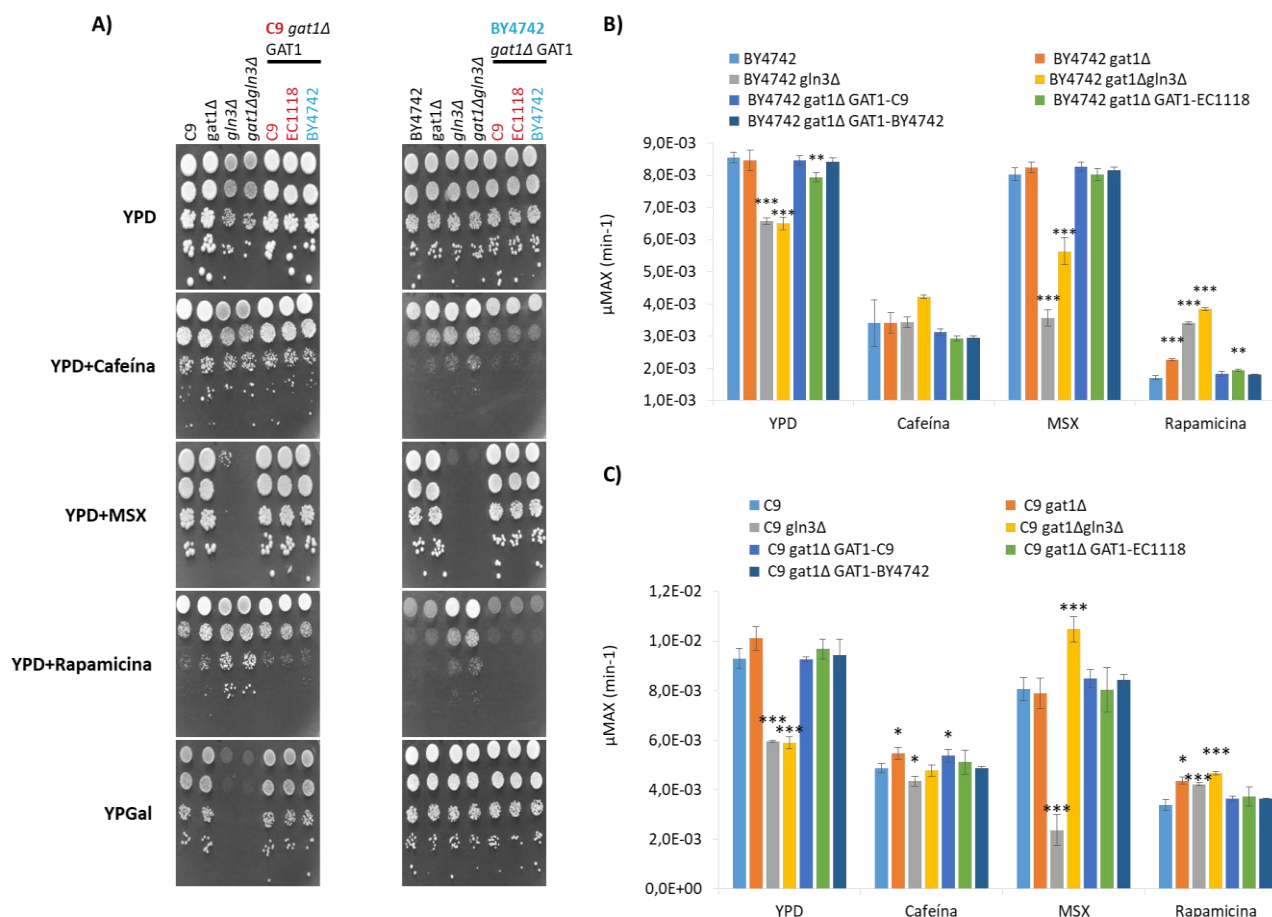
El reemplazamiento de alelos se llevó a cabo en la cepa vínica C9 y en la cepa de laboratorio BY4742 en las cuales se había delecionado previamente el gen *GAT1* para evitar interferencias con la inserción del gen *GAT1* de interés, y se añadió al estudio el gen *GAT1* procedente de la cepa diploide EC1118. Se recurrió a la cotransformación con dos productos de PCR parcialmente solapantes (Matsui et al., 2015; Reid et al., 2002) que, gracias al mecanismo de recombinación homóloga característico de *S. cerevisiae*, se pueden insertar de forma contigua en el genoma. Los mutantes del reemplazamiento de alelos se comprobaron por secuenciación, confirmando las sustituciones planificadas y la obtención de una cepa vínica C9 con el alelo *GAT1* de la cepa de laboratorio BY4742 y una cepa vínica C9 con el alelo *GAT1* de la cepa vínica EC1118, así como de una cepa de laboratorio BY4742 con el alelo *GAT1* de la cepa vínica C9 y una cepa BY4742 con el alelo *GAT1* de la cepa vínica EC1118. En ambos casos, se reintrodujo también el alelo propio de la cepa que se estaba manipulando.

#### 2.4.1. Análisis fenotípico de los mutantes de reemplazamiento

Una vez obtenidos los mutantes se llevó a cabo un análisis del fenotipo de crecimiento de los mismos para observar si el cambio del alelo del gen *GAT1* en las cepas vínicas modificaba el fenotipo de la cepa de laboratorio y viceversa. Inicialmente se realizaron goteos en placa con cafeína y rapamicina (ambos inhibidores de TORC1) y L-metionina sulfoximina (MSX; ayuno de nitrógeno). Además, también se analizó el crecimiento en presencia de una fuente de carbono

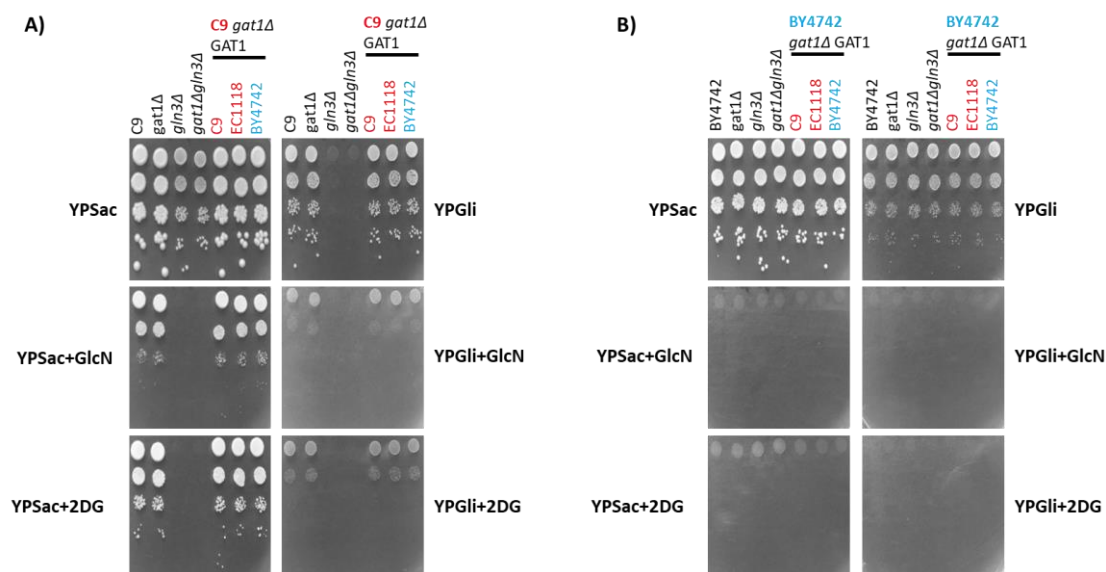
no fermentable como la galactosa. También se realizaron curvas de crecimiento en medio completo YPD en presencia de los inhibidores anteriormente analizados. Se incluyeron como controles los mutantes simples *gat1Δ* y *gln3Δ* y el doble mutante *gat1Δgln3Δ*. Los resultados de los análisis se muestran en la Figura 104. En el panel A se observa que el crecimiento de las cepas con reemplazamiento de alelos es indistinguible de su correspondiente parental, independientemente de la cepa donde se ha realizado y del origen del alelo *GAT1* reimplantado, lo que indica que las diferencias de secuencia detectadas en dicho gen entre las cepas vínicas y las cepas de laboratorio no ocasionan diferencias fenotípicas.

Con el fin de obtener una medida cuantitativa del efecto de los inhibidores, también se realizaron curvas de crecimiento en presencia de rapamicina, cafeína o MSX de las mismas cepas (Figura 104 panel B), con resultados muy similares a los obtenidos en placa. El fenotipo de los mutantes de reemplazamiento de alelos difiere muy ligeramente de los mutantes de delección, simple o doble mutante, por lo que se descarta una pérdida de función del gen *GAT1*. La mayor parte de las diferencias estadísticamente significativas observadas en las curvas de crecimiento son como consecuencia de la delección del gen *GAT1*, del gen *GLN3* o de ambos pero no de los mutantes de reemplazamiento. La cepa de laboratorio BY4742 con el gen *GAT1* procedente de la cepa vínica EC1118 crece mejor en presencia de rapamicina que la cepa BY4742. Sin embargo, dicha diferencia de crecimiento no puede observarse en el crecimiento en placa. Por otra parte, las únicas diferencias estadísticamente significativas observadas en la cepa C9 corresponden al control realizado con el gen *GAT1* procedente de C9. Dichas diferencias tampoco son observables en los goteos en placa.



**Figura 104.** Análisis de crecimiento de los mutantes de reemplazamiento del gen *GAT1* en los fondos genéticos C9 y BY4742 en presencia de diversos inhibidores químicos y fuentes de carbono. Goteos de las cepas indicadas en medio completo YPD en presencia de cafeína (10 mM), L-metionina sulfoximina (MSX, 1 mM) y rapamicina (100 nM) y en presencia de galactosa (YPGal) como única fuente de carbono (A). Velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{MAX}$ , min<sup>-1</sup>), calculada mediante el programa GrowthRates a partir de las curvas de crecimiento en medio completo YPD o con los inhibidores indicados en el panel A) de los fondos genéticos BY4742 (B) o C9 (C). El análisis estadístico se realiza respecto a la cepa silvestre en cada medio analizado. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de las medias (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica.

El estudio de posibles fenotipos de crecimiento en las cepas con reemplazamiento alélico del gen *GAT1* se extendió al cultivo en presencia de análogos estructurales no metabolizables de la glucosa, como la 2-desoxiglucosa o la glucosamina, tanto en medio fermentativo YPSacarosa (YPSac) como en medio respiratorio YPGlicerol (YPGli), Figura 105. Ni en presencia de sacarosa ni en presencia de glicerol se observan diferencias en el crecimiento en función del origen del gen *GAT1* insertado. El crecimiento observado en presencia de 2DG o GlcN, aunque en glicerol es mucho menor, es el mismo en todos los mutantes.



**Figura 105.** Análisis de crecimiento de los mutantes de reemplazamiento del gen *GAT1* en los fondos genéticos C9 (A) y BY4742 (B), en presencia de análogos estructurales de la glucosa. Se muestran los goteos realizados de las cepas indicadas en medio YPSac o YPGli en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) o 2-desoxiglucosa (2DG, 100  $\mu$ g/mL). Azul: cepa de laboratorio. Rojo: cepa vínica.

Los mutantes de reemplazamiento de alelos en la cepa C9 también se analizaron en condiciones de vinificación mediante fermentaciones estandarizadas durante la estancia realizada en el laboratorio del Dr. Philippe Marullo. El fenotipo observado de los mutantes de clonación en comparación con la cepa C9 dentro de la misma condición es el mismo sugiriendo que la aparición de una serina y una alanina adicional en la secuencia del gen *GAT1* en las cepas vínicas (Figura 103 panel B) no es la responsable de su fenotipo diferencial en condiciones de vinificación.

Las peculiaridades del gen *GAT1*, no solo por la diferencia de secuencia detectada entre cepas vínicas y cepas de laboratorio, sino por la compleja regulación a niveles transcripcional y traduccional, a pesar de ser considerado un factor secundario frente a papel predominante de Gln3p, sugieren funciones todavía no descritas que las justifiquen. En este apartado se ha llevado a cabo el reemplazamiento de alelos del gen *GAT1* entre cepas de laboratorio y vínicas, y se ha ensayado su efecto sobre el crecimiento en distintas condiciones de interés en el contexto de este trabajo. No se ha encontrado ninguna variación fenotípica asociada en las condiciones analizadas, probablemente debido a la redundancia entre Gat1p y Gln3p.

### 3. Papel de las proteínas que forman parte de las rutas de señalización de fuente de carbono. Implicación en condiciones de vinificación.

En el capítulo 1 se determinó, mediante el estudio del estado de fosforilación de dianas clave de las rutas de señalización de nutrientes a lo largo de la vinificación, que la ruta Ras/cAMP/PKA es la que está más activa durante toda la fermentación. Para investigar el papel de componentes concretos de dicha ruta se construyeron mutantes de delección en proteínas clave en los dos sistemas de detección de la glucosa, Ras y el asociado a la membrana vía Gpr1p. Además, se escogieron otras proteínas que tienen relación con el uso de fuentes alternativas de carbono o que regulan la respiración, como la ruta SNF1 o la respuesta retrógrada. En primer lugar se analizará la variación alélica en reguladores de la producción de cAMP como *RGS2* y *SDC25* y las diversas contribuciones de las proteínas Ras, Ras1p y Ras2p, y de las fosfodiesterasas, Pde1p y Pde2p.

#### 3.1. Estudio de la función de *RGS2* en diversas cepas

##### 3.1.1. Análisis de crecimiento mediante goteos en placa

La actividad de la adenilato ciclasa codificada por el gen *CYR1* está regulada tanto por las proteínas Ras como por la proteína de membrana Gpr1p (Figura 3). Gpr1p es un receptor situado en la membrana plasmática que interacciona con la proteína de unión a GTP Gpa2p. El intercambio de GTP a GDP y, por tanto, la inactivación de Gpa2p, es llevado a cabo por la proteína Rgs2p. Como consecuencia, Rgs2p se conoce como un regulador negativo de la señalización de glucosa a través de los niveles de cAMP. La sobreexpresión de Rgs2p causa un aumento de la acumulación de trehalosa y glucógeno así como un aumento de la resistencia a estrés, fenotipo característico de una baja actividad de PKA. Por el contrario, la delección aumenta los niveles de cAMP y, con ello, la activación de PKA (Versele et al., 1999).

Por otra parte, Eder et al., (2018) identificaron, mediante QTLs (*Quantitative Trait Loci*), la existencia de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) no sinónimos presentes en diversos genes como *RGS2* y *RGT1* (ver más adelante), en correlación con diferencias en la producción de aromas, en concreto, de ésteres, alcoholes superiores y ácidos grasos. La observación de las secuencias del gen *RGS2* procedentes de diversas cepas de *S. cerevisiae* indicó que las cepas de laboratorio más comunes derivadas de S288c presentaban una proteína con una región C-terminal más corta que otras cepas como  $\Sigma$ 1278, otras cepas industriales y la mayoría de cepas vínicas analizadas (Figura 106 panel A). La proteína Rgs2p procedente de las cepas de laboratorio carece de 43 aminoácidos que están presentes en las cepas industriales. Además, debido a la delección de un único nucleótido en las cepas de laboratorio, los últimos 8 aminoácidos de la proteína Rgs2p también difieren respecto de las cepas industriales. La forma extendida de la proteína está presente en otras especies del género *Saccharomyces* (Figura 106 panel B), lo cual sugiere que las cepas de laboratorio han perdido esta región terminal.



A)

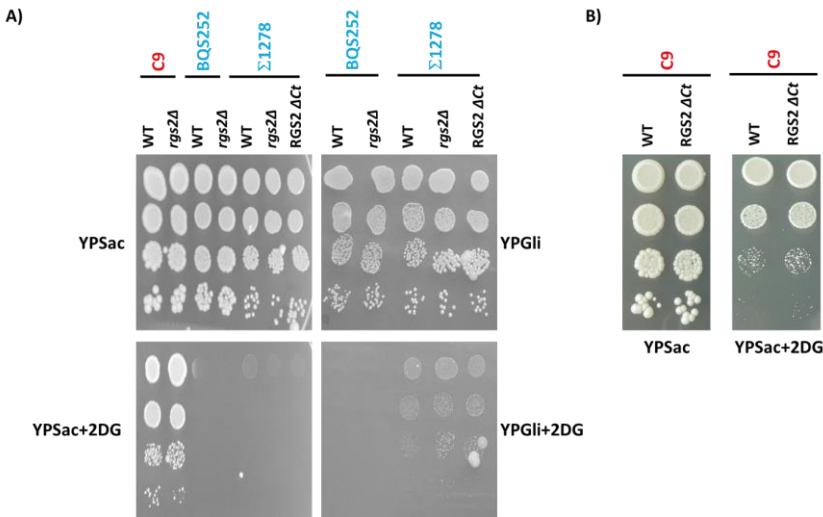
S288C	KGONSHQQR-----	309
BY4742	KGONSHQQR-----	309
Σ1278	KRTKQSSTKIASSSSSVETQISSSSSPLPNKAIGKNEKSVENGFKKLNLDIS	311
M2	KRTKQSSTKIASSSSSVETQISSSSSPLPNKAIGKNEKSVENGFKKLNLDIS	352
EC1118	KRTKQSSTKIASSSSSVETQISSSSSPLPNKAIGKNEKSVENGFKKLNLDIS	352
	* :. . :	

B)

<i>S. uvarum</i>	NHLKRAKQSPAITT-----SSSPSSFPPPTATGLNEKSVENGFOKLNLDIA	338
<i>S. mikatae</i>	RHLKRAKQSSTTVSSSSSKNTESSSSSPLPLINKAIDHKEKSVEKGFKKLNLDIN	353
<i>S. cerevisiae</i>	NRLKGQNSHQQR-----	309
<i>S. paradoxus</i>	NHLRRTKQPSTNITSSSSMKAEISLSSSPLPNKAIGQNVKSVEKGFKKLNLDIN	352
	.:* : .:	

**Figura 106.** Secuencia de la proteína Rgs2p en diferentes fondos genéticos y especies. Diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína Rgs2p en cepas de laboratorio (azul) y en cepas vínicas (Rojo) de *S. cerevisiae* (A). Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína Rgs2p en diferentes especies del género *Saccharomyces* (B). La cepa de referencia utilizada de *S. cerevisiae* es S288C.

Para estudiar la posible importancia de estas diferencias de secuencia en los fenotipos diferenciales de las cepas vínicas y de laboratorio en la señalización por glucosa, se construyeron mutantes *rgs2Δ* en diversos fondos genéticos y se construyó una versión truncada de Rgs2p en la cepa Σ1278 y en la cepa vínica C9 mimetizando el codón de parada en la misma posición en la que está presente en cepas de laboratorio. Se analizó el crecimiento mediante goteos en placa frente a 2-desoxiglucosa para observar si se había modificado la señalización que da lugar a la represión catabólica por glucosa (Figura 107) tanto en presencia de sacarosa como en presencia de glicerol.



**Figura 107.** Análisis de crecimiento del mutante *rgs2Δ* en diferentes fondos genéticos y de cepas con versiones trucadas de la proteína Rgs2p. Goteos en placa del mutante *rgs2Δ* en los fondos genéticos C9, BQS252 y Σ1278 junto con la cepa Σ1278 que presenta la proteína Rgs2p truncada en el extremo C-terminal (RGS2 ΔCt) (A). Goteos en placa de la cepa C9 que presenta la proteína Rgs2p truncada en el extremo C-terminal (RGS2 ΔCt) (B). Los goteos se han realizado

en medio completo con sacarosa o glicerol como fuente de carbono con 2-desoxiglucosa (2DG, 100 µg/mL). WT: cepa silvestre (Wild Type) Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

---

Todos los mutantes *rgs2Δ* son capaces de crecer en presencia de sacarosa o glicerol como fuente de carbono, sin ningún tipo de diferencia respecto a sus cepas silvestres (Figura 107 panel A). En presencia de 2DG, las cepas C9, C9 *rgs2Δ* y C9 *rgs2 ΔCt* crecen vigorosamente (panel B). El crecimiento de los derivados del fondo genético S288c como BQS252 está totalmente inhibido por la 2DG, y aquellos derivados de Σ1278 en gran medida. No se detectan consecuencias fenotípicas derivadas de la presencia de una proteína Rgs2p truncada, como parece razonable dado que tampoco hay fenotipo en el mutante *rgs2Δ* en las condiciones ensayadas.

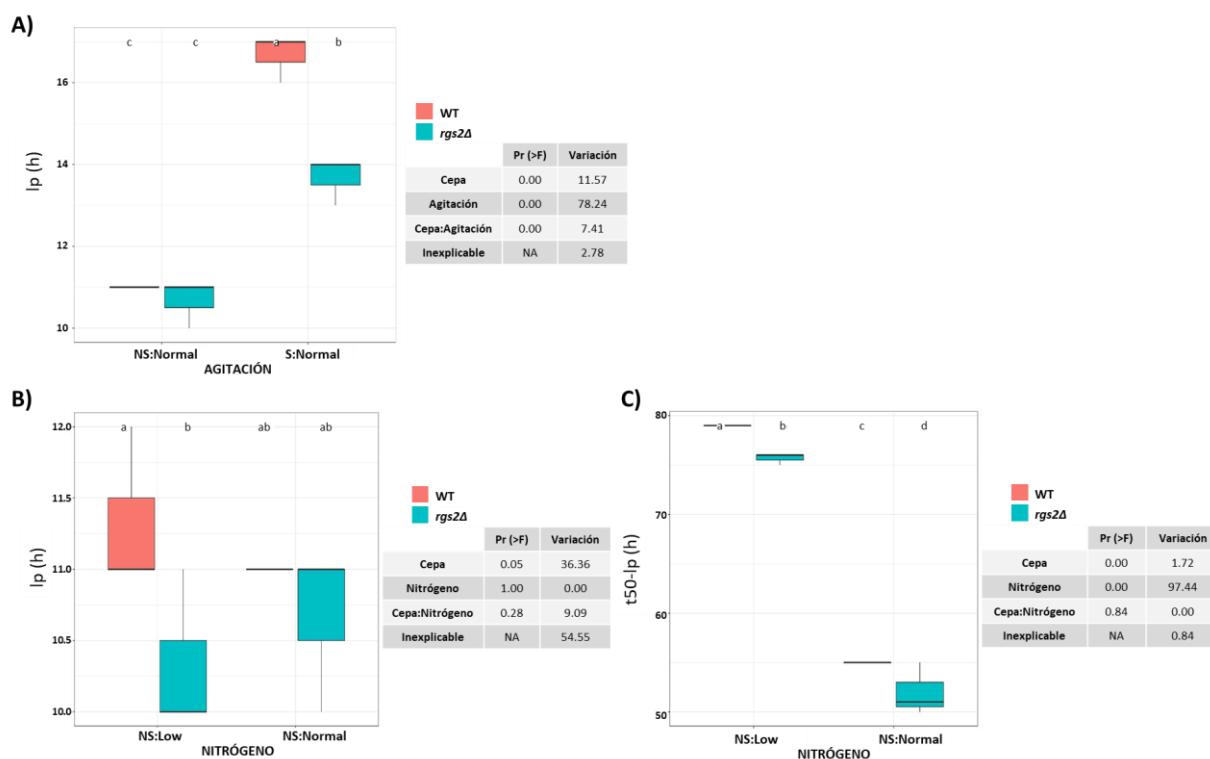
### 3.1.2. Análisis fenomíco de la deleción de *RGS2* en condiciones de vinificación

Dadas las diferencias repetidamente observadas entre condiciones de laboratorio y de vinificación, se analizó el fenotipo del mutante C9 *rgs2Δ* en estas últimas condiciones. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:Shaken) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken). El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos ( $I_p$ ,  $t_{35/50/80-I_p}$ ,  $v_{50\_80}$ ) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa.

De entre todos los parámetros analizados al comparar agitación con fermentación estática únicamente se observaron diferencias entre la cepa silvestre y el mutante de deleción en la fase de latencia, Figura 108 panel A. Se observa que el mutante *rgs2Δ* en condiciones de agitación presenta una fase de latencia ( $I_p$ ) menor que su respectiva cepa silvestre, no así en estático (NS:Normal). Los datos estadísticos muestran que el 78.24 % de la variación observada es como consecuencia de la agitación y no de la deleción de *RGS2*. El mutante *rgs2Δ* es más sensible a estrés oxidativo (Lin et al., 2011) por lo que la reducción en la fase de latencia en condiciones de agitación podría ser como consecuencia de un uso acelerado del oxígeno del medio. Sin embargo, la agitación no influye en la capacidad fermentativa de dicho mutante ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas ni en la velocidad de producción ni el tiempo para liberar el CO<sub>2</sub> (datos no mostrados). Teóricamente, la deleción de *RGS2* aumentaría la actividad de PKA, sin embargo no se observa un fenotipo claro para el mutante de deleción sugiriendo que deben existir mecanismos adicionales que mantienen el control de la actividad de la ruta, posiblemente la rama de las proteínas Ras.

También se analizó el fenotipo del mutante *rgs2Δ* en condiciones de no agitación, más similares a las del proceso industrial, con concentraciones de nitrógeno normal o deficiente. Las comparaciones en los parámetros de  $I_p$  y  $t_{50-I_p}$  se muestran en los paneles B y C de la Figura 108. Se produce una reducción en la fase de latencia en el mutante *rgs2Δ* cuando hay deficiencia de nitrógeno, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa. Dicha diferencia explica el 36.36 % de la variación observada ya que, en este caso, el nitrógeno no influye en la fase de latencia del mutante *rgs2Δ*. Respecto al  $t_{50-I_p}$  (panel B), es el único parámetro analizado en el que se observa, en ambas condiciones, diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *rgs2Δ*, aunque el 97.44 % de la variación es como consecuencia de la diferencia en la concentración de nitrógeno. En ambas condiciones, la deleción de *RGS2*

disminuye de manera estadísticamente significativa el tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub>. Esas diferencias no son apreciables en los parámetros t35-lp y t80-lp. Más adelante se discutirá el fenotipo observado de la delección de *RGS2* en comparación con otros mutantes de la ruta Ras/cAMP/PKA.

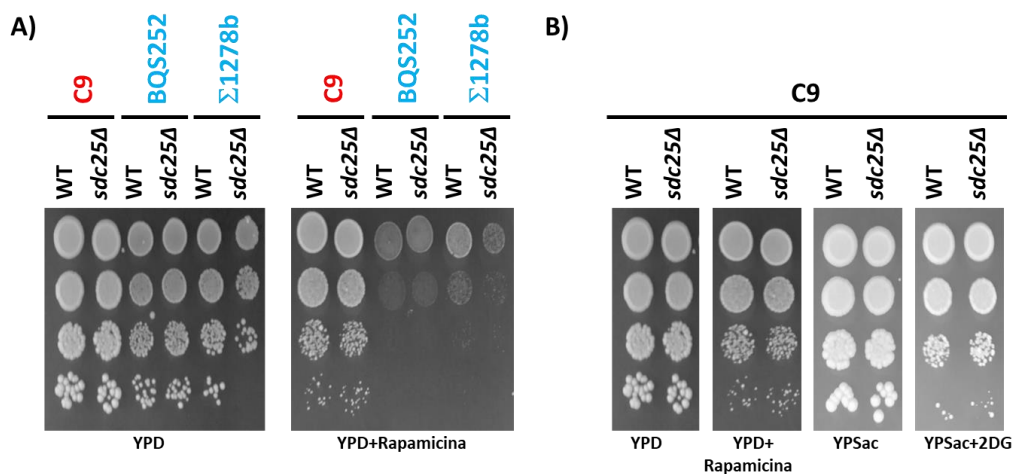


**Figura 108.** Efecto de la delección del gen *RGS2* en los parámetros cinéticos durante la fermentación alcohólica en mosto Sauvignon Blanc. Fase de latencia (lp) en condiciones de agitación y no agitación con concentración normal de nitrógeno (A). Efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la fase de latencia (lp) (B) y en el tiempo para liberar el 50 % del CO<sub>2</sub> (t50-lp) sin tener en cuenta la fase de latencia (C). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. NS:Low: no agitación (Not Shaken) bajo nitrógeno; NS:Normal: no agitación (Not Shaken) nitrógeno normal; S:Normal: agitación (Shaken) nitrógeno normal. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con diferentes letras. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

### 3.2. Estudio del gen *SDC25* en diversas cepas

Como se ha comentado anteriormente, la actividad de la adenilato ciclasa Cyr1p está regulada tanto por la proteína Gpa2p como por las proteínas Ras1/2p, ambas proteínas de unión a GTP. Mientras que las proteínas Ira1/2p inducen la actividad GTPasa de Ras1/2p, la proteína Cdc25p facilita el cambio de GDP a GTP induciendo así la actividad de Cyr1p a través de Ras1/2p-GTP. *SDC25* es un homólogo a *CDC25* en *S. cerevisiae* y presenta al igual que Cdc25p, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factor*, GEF) que actúa sobre las proteínas Ras. Mientras que la delección de *CDC25* es letal en diversas cepas de *S. cerevisiae*, en otras la sobreexpresión de *SDC25* es capaz de rescatar el fenotipo de un mutante *cdc25Δ* (Boy-Marcotte et al., 1996; Damak et al., 1991).

La ORF YLL017w que codifica para el gen *SDC25* está descrita como un pseudogen en la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (Lafontaine et al., 2004; Miosga y Zimmermann, 1996). Kellis et al., (2003) demostraron la fusión entre las ORFs YLL016W e YLL017W (*SCD25*), como consecuencia de la eliminación de un codón de parada que da lugar a una pauta de lectura abierta de tamaño mucho mayor, que parece ser transcrita en toda su longitud. Sin embargo, las cepas vínicas no presentan dicho codón de parada. Al estar el gen *SDC25* implicado en la activación de la proteína Cyr1p a través de Ras1/2p y, por tanto, en la actividad de PKA se estudió si las diferencias observadas en su secuencia están implicadas en el fenotipo diferenciador entre cepas vínicas y cepas de laboratorio. Para ello, se construyeron los mutantes *sdc25Δ* en la cepa vínica haploide C9 y en las cepas de laboratorio BQS252 y  $\Sigma$ 1278. Si este gen presenta una actividad PKA mayor en levaduras industriales, su delección debería provocar un fenotipo más similar a lo observado en cepas de laboratorio. Inicialmente se realizaron estudios de crecimiento mediante goteos en presencia de rapamicina ya que anteriormente se observó que la tolerancia de las cepas vínicas a dicho compuesto era mayor. Los resultados se muestran en la Figura 109. Tanto la cepa C9 como su respectivo mutante C9 *sdc25Δ* crecen normalmente en presencia de rapamicina, al igual que las cepas BQS252 y  $\Sigma$ 1278 y sus mutantes *sdc25Δ*, aunque la sensibilidad basal de estas últimas es mayor (panel A). Como *SDC25* también está implicado en la captación de otras fuentes de carbono, se analizó la tolerancia del mutante *sdc25Δ* al análogo estructural de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (panel B). En este caso, tampoco se observan diferencias en la tolerancia a 2DG ni tampoco en el crecimiento en presencia de sacarosa en la cepa C9. Al no observarse diferencias en la tolerancia a la rapamicina entre las cepas silvestres y sus mutantes *sdc25Δ*, ese fenotipo no puede atribuirse al gen *SDC25*, como se había planteado inicialmente.



**Figura 109.** Análisis de crecimiento del mutante *sdc25Δ* en diferentes fondos genéticos. Goteos en placa del mutante C9 *sdc25Δ* en medio completo YPD en presencia de rapamicina (100 nM) o en medio con sacarosa (YPSac) en presencia de 2-desoxiglucosa (2DG, 100  $\mu$ g/mL) (A). Goteos en placa del mutante *sdc25Δ* en las cepas de laboratorio BQS252 y  $\Sigma$ 1278 y en la cepa vínica haploide C9 en presencia de rapamicina (100 nM) (B). WT: cepa silvestre (Wild Type) Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas.

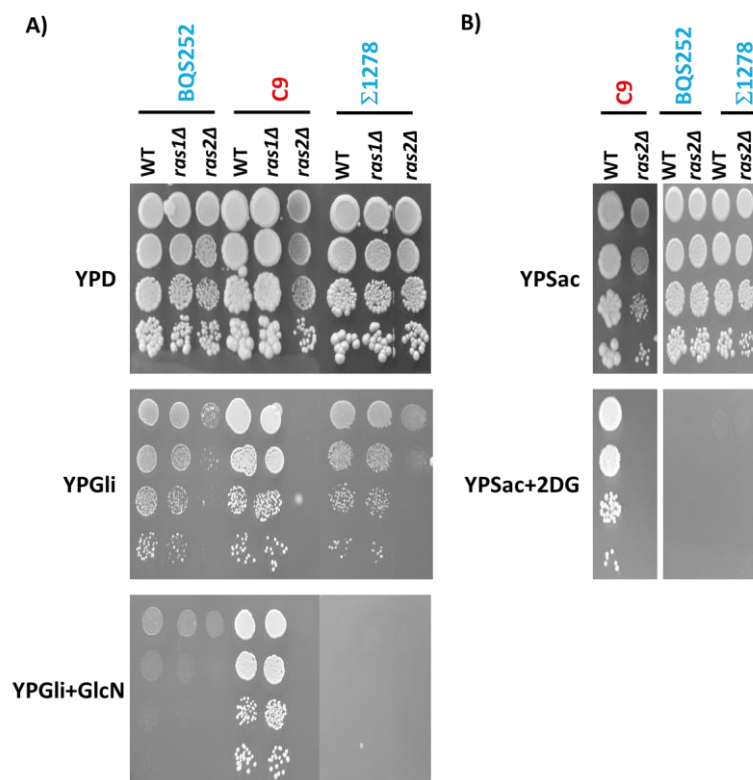
### 3.3. Estudio de las proteínas de unión a GTP Ras1p y Ras2p en diversas cepas

#### 3.3.1. Comparación fenotípica frente a inhibidores químicos

Dado que las variaciones alélicas de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina no resulta ser clave en la diferencia fenotípica entre cepas de laboratorio y vínicas, se abordó el estudio de las proteínas Ras, Ras1p y Ras2p, con funciones solapantes pero también diferenciadoras (Mösch et al., 1999). Ambas inducen la activación de la adenilato ciclasa Cyr1p cuando presentan GTP unido, lo que aumenta los niveles de cAMP, y con ello la activación de PKA. Está descrito que mutantes de delección en alguna de las proteínas Ras presentan actividad PKA reducida, lo que genera defectos en la respiración, acumulación de carbohidratos de reserva y aumento de la longevidad cronológica, mientras que el doble mutante *ras1Δras2Δ* no es viable.

Se construyeron los mutantes simples *ras1Δ* y *ras2Δ* en las cepas C9, BQS252 y Σ1278 y se analizó su crecimiento mediante goteos en presencia de glicerol como fuente de carbono alternativa (panel A) o sacarosa como fuente fermentable (panel B) y en presencia de GlcN o 2DG que producen represión por glucosa, Figura 110. El mutante *ras2Δ* en las cepas BQS252 y C9 presenta un déficit de crecimiento incluso en medio completo YPD; mientras que el crecimiento de Σ1278 *ras2Δ* es similar a su respectiva cepa silvestre. No se observan diferencias de crecimiento en medio completo YPD para los mutantes *ras1Δ*. En presencia de glicerol, una fuente de carbono no fermentable, los fenotipos observados se mantienen para las cepas C9 y BQS252 pero Σ1278 *ras2Δ* presenta un crecimiento menor, igual que en la cepa S288c en presencia de etanol (Yoshikawa et al., 2009). En todas las cepas analizadas se observa que el mutante *ras1Δ* no presenta ningún déficit de crecimiento ni en medio YPD ni en presencia de glicerol; en cambio, la delección del gen *RAS2* sí que causa un crecimiento menor en glicerol en las cepas BQS252 y Σ1278 y un crecimiento nulo en el mutante C9 *ras2Δ*. Estos resultados sugieren que *RAS2* estaría implicado en el uso de fuentes de carbono no fermentables a diferencia de *RAS1*. El mutante C9 *ras1Δ* en presencia de glucosamina presenta el mismo crecimiento que su cepa silvestre C9, y no afecta al pobre crecimiento en el fondo BQS252, por lo que la mayor tolerancia a dicho inhibidor es como consecuencia de la cepa y no del mutante analizado. Los fenotipos observados para la delección de *RAS2* en el panel A de la Figura 110 son los mismos que los observados en el panel B pero en presencia de sacarosa como fuente de carbono y 2-desoxiglucosa.

Es destacable el fenotipo de la cepa Σ1278, en la que se ha descrito una hiperactividad de PKA en condiciones normales de crecimiento y una mayor tolerancia a rapamicina. Sería de esperar que dicha cepa presentara un déficit de crecimiento en condiciones de represión por glucosa, tal y como se observa en el panel A de la Figura 110 en presencia de GlcN. Sin embargo, esa ausencia de crecimiento nulo no puede explicarse en base a su mayor actividad PKA a través de las proteínas Ras ya que los mutantes simples *ras1Δ* y *ras2Δ* no presentan recuperación del crecimiento. Es posible que esa mayor actividad de PKA proceda del otro mecanismo de detección de glucosa Gpr1p a través de Gpa2p.



**Figura 110.** Análisis de crecimiento de los mutantes *ras1Δ* y *ras2Δ* frente a inhibidores químicos. Goteos en placa en medio con glicerol (YPGli) como fuente de carbono en presencia de glucosamina (GlcN, 0.05 %) de los mutantes *ras1Δ* y *ras2Δ* en las cepas de laboratorio BQS252 y Σ1278 y en la cepa vínica haploide C9 (A). Goteos en placa en medio con sacarosa (YPSac) como fuente de carbono en presencia de 2-desoxiglucosa (2DG, 100 µg/mL) de los mutantes *ras2Δ* en las cepas C9, BQS252 y Σ1278 (B). Azul: cepas de laboratorio. Rojo: cepas vínicas. WT: cepa silvestre (Wild Type).

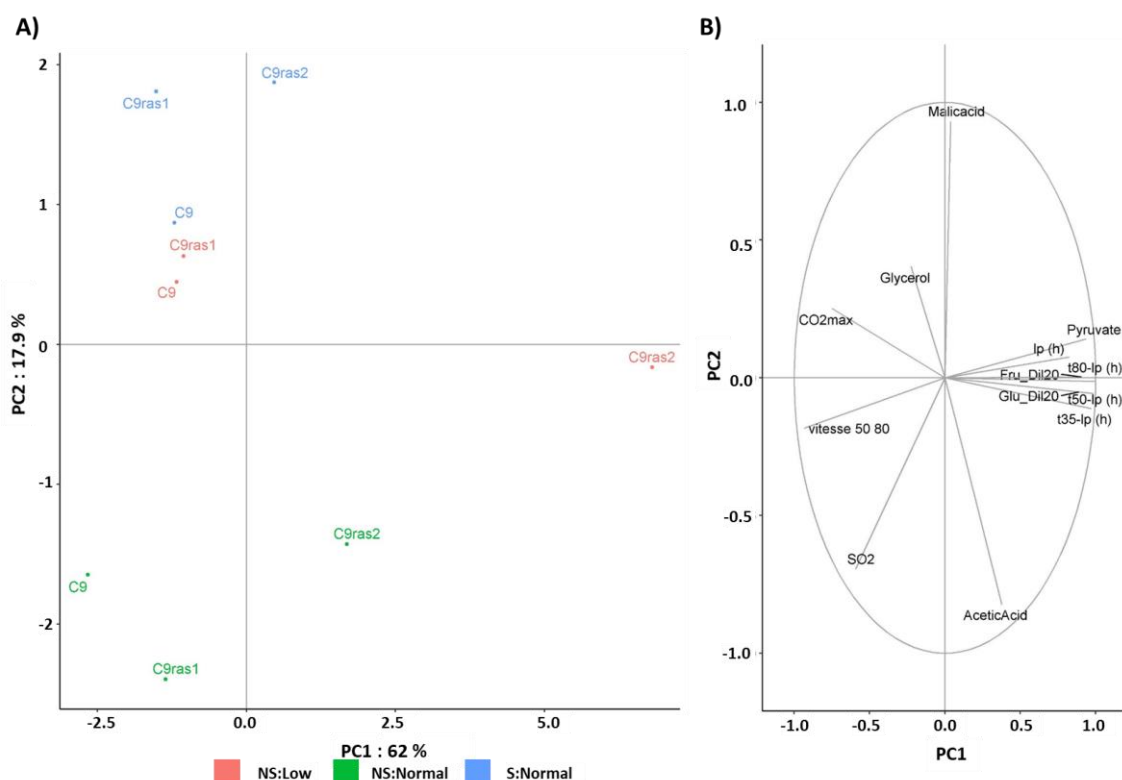
Mientras que el fenotipo de los mutantes *ras1Δ* es similar al de las cepas silvestres, el déficit de crecimiento de los mutantes *ras2Δ* sugiere que la proteína Ras2p está implicada en la respiración. Así pues, también se analizó el fenotipo de los mutantes *ras2Δ* en presencia de sacarosa (Figura 110 panel B), cuya utilización requiere la desrepresión del uso de fuentes fermentables de carbono alternativas a la glucosa pero no la del metabolismo respiratorio. El déficit de crecimiento observado en presencia de glicerol no se mantiene en presencia de sacarosa para los mutantes *ras2Δ* ya que se observa crecimiento en todas las cepas analizadas. Sin embargo, la cepa C9 *ras2Δ* presenta una represión por glucosa aumentada en estas condiciones, siendo tan sensible a 2DG como las cepas de laboratorio, lo que sugiere que las diferencias al respecto entre distintas cepas pueden estar relacionadas con la activación de esta rama de la ruta PKA. Estos resultados sugieren que la proteína Ras2p estaría implicada en la desrepresión del metabolismo respiratorio, tal como sugieren Peeters et al., (2017).

### 3.3.2. Análisis fenómico de Ras1p y Ras2p en condiciones de vinificación

Como en el resto de mutantes analizados, se llevaron a cabo vinificaciones en mosto Sauvignon Blanc con los mutantes deleción de las proteínas Ras1p y Ras2p en la cepa vínica haploide C9. Las condiciones seleccionadas para las fermentaciones alcohólicas fueron: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: Not Shaken), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:Shaken) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: Not Shaken). Para

simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos ( $l_p$ ,  $t_{35/50/80-l_p}$ ,  $v_{50\_80}$ ) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el  $SO_2$ , la glucosa y la fructosa.

En la Figura 111 se observa el análisis de los componentes principales (PCA) de los mutantes analizados junto con su respectiva cepa silvestre en las condiciones analizadas (panel A) y la correlación de todos los parámetros determinados, tanto enológicos como cinéticos (panel B). El mutante *ras2Δ* se encuentra totalmente alejado del resto de mutantes y cepas analizadas, presentando valores positivos del componente principal 1 mientras que el resto de las cepas presenta valores negativos. Esa diferenciación indica que la tendencia de todas las variables analizadas y comprendidas en el componente principal 1 del mutante *ras2Δ* presentan una correlación negativa con las de la cepa silvestre y el mutante *ras1Δ*. Sorprendentemente el mutante que más alejado se encuentra es el mutante *ras2Δ* en la condición NS:Low (color rojo) ya que se encuentra, tanto en el componente principal 1 como en el 2, en valores opuestos a C9 y *ras1Δ*. El círculo de correlación observado en el panel B indica que existe una relación negativa entre la velocidad de producción media de  $CO_2$  entre el 50 y el 80 % de  $CO_2$  (vitesse 50 80) y la concentración de piruvato, indicativa de la eficiente conversión del piruvato en etanol. Esa relación negativa también se observa entre el ácido acético y el glicerol, aunque la relación es más débil debido a la corta flecha que presenta el glicerol.



**Figura 111.** Análisis global de los mutantes de delección en las GTPasas Ras1p y Ras2p implicadas en la ruta Ras/cAMP/PKA en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de los mutantes *ras1Δ* y *ras2Δ* (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not*

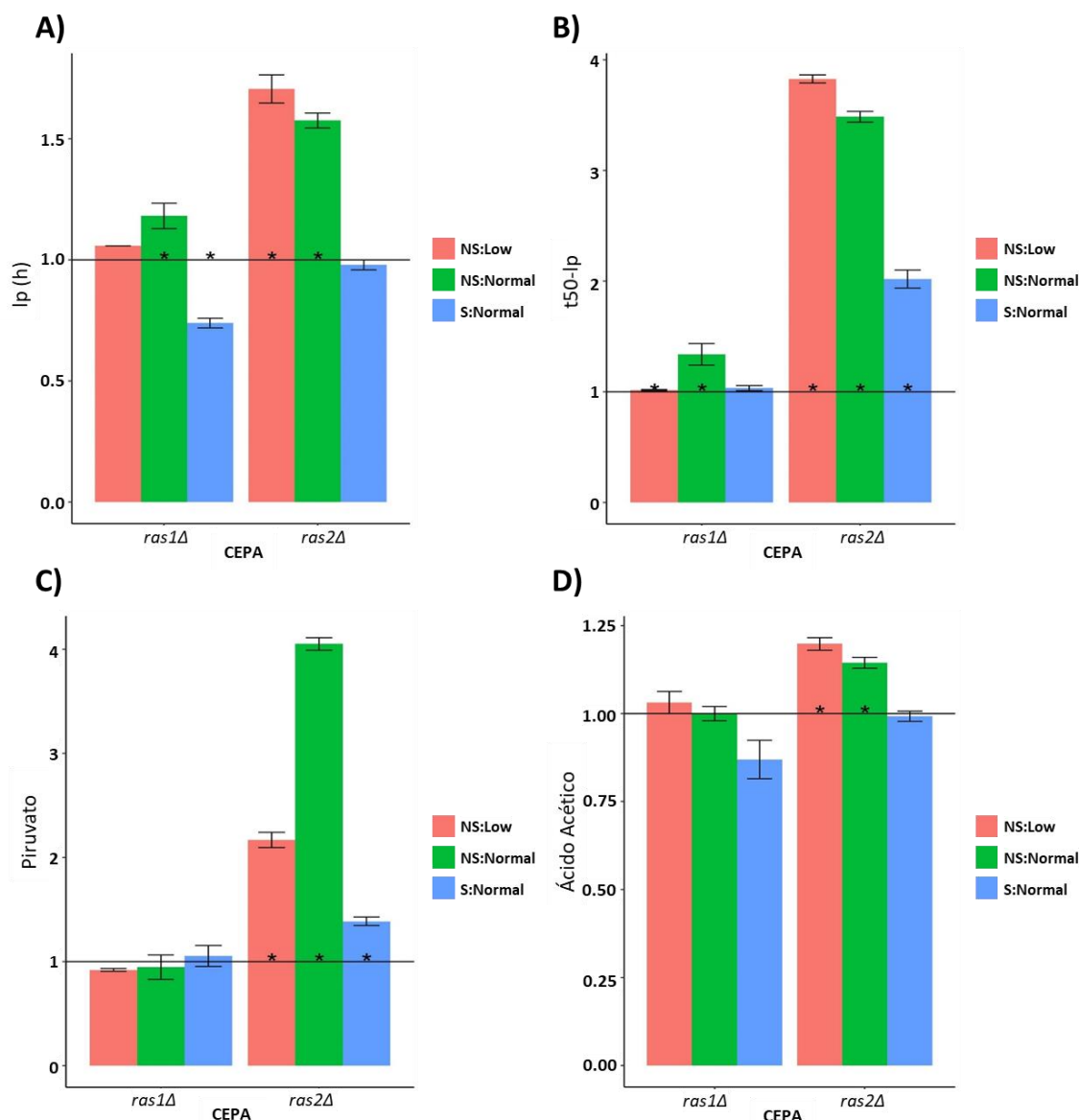
*Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (lp), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta lp (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_Dil20 y Fru\_Dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

Todos los mutantes fueron capaces de finalizar la fermentación en condiciones de agitación y concentración normal de nitrógeno (S:Normal), aunque el mutante *ras2Δ* requirió tiempos largos. En concentración normal de nitrógeno pero sin agitación (NS:Normal), el mutante *ras1Δ* finalizó a tiempos elevados la fermentación aunque en condiciones de agitación no presentó ningún problema. En condiciones de deficiencia de nitrógeno (NS:Low) el mutante *ras2Δ* no fue capaz de finalizar la fermentación y, como consecuencia, presenta glucosa (6.90 g/L) y fructosa residual (18.67 g/L). En la Figura 112 pueden observarse algunos de los parámetros relevantes en los mutantes de delección en las proteínas Ras. En este caso se ha optado por la representación de los datos normalizados para poder comparar simultáneamente el efecto de la delección de ambas proteínas. En condiciones NS:Normal (barra verde) ambos mutantes presentan un retraso en la fase de latencia (panel A). Sin embargo, en condiciones normales de disponibilidad de nitrógeno en agitación (S:Normal, barra azul) el mutante *ras1Δ* presenta una fase de latencia menor que la cepa silvestre (C9) y en condiciones de no agitación (NS:Normal y NS:Low, barras verde y roja), independientemente de la concentración de nitrógeno, la fase de latencia del mutante *ras2Δ* es mayor. Respecto al tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> sin tener en cuenta lp (t50-lp, panel B), el mutante *ras2Δ* tarda más en realizar la fermentación alcohólica presentando una capacidad fermentativa menor en todas las condiciones analizadas. Estos resultados indican que la proteína de unión a GTP Ras2p está implicada en condiciones de fermentación alcohólica y que es necesaria para obtener una buena fermentación. Sin embargo, la proteína Ras1p únicamente parece tener implicación en la fermentación alcohólica en condiciones de NS:Normal, pues en las demás condiciones aunque presenta una fase de latencia afectada, la capacidad fermentativa es la misma.

El mutante *ras2Δ* no es capaz de finalizar la fermentación en condiciones NS:Low y además presenta una acumulación de piruvato dos veces mayor que la de la respectiva cepa silvestre C9 (panel C). La condición NS:Normal (barra verde) es la que mayor acumulación de piruvato presenta, 4 veces más que la cepa C9. Está descrito que un mutante *ras2Δ* (Yoshikawa et al., 2009) no es capaz de crecer en fuentes de carbono como el etanol y el glicerol por lo que puede presentar problemas en la respiración, lo que podría explicar la mayor acumulación de piruvato, aunque en condiciones de vinificación la respiración no tiene lugar. Parte del piruvato se dirige hacia la síntesis de ácido acético puesto que el mutante *ras2Δ* también presenta una acumulación de dicho compuesto (panel D). Sin embargo, dicha acumulación únicamente es 1.2 y 1.4 mayor que en la cepa silvestre C9 en condiciones S:Normal (barra azul) y NS:Normal (barra verde), respectivamente.





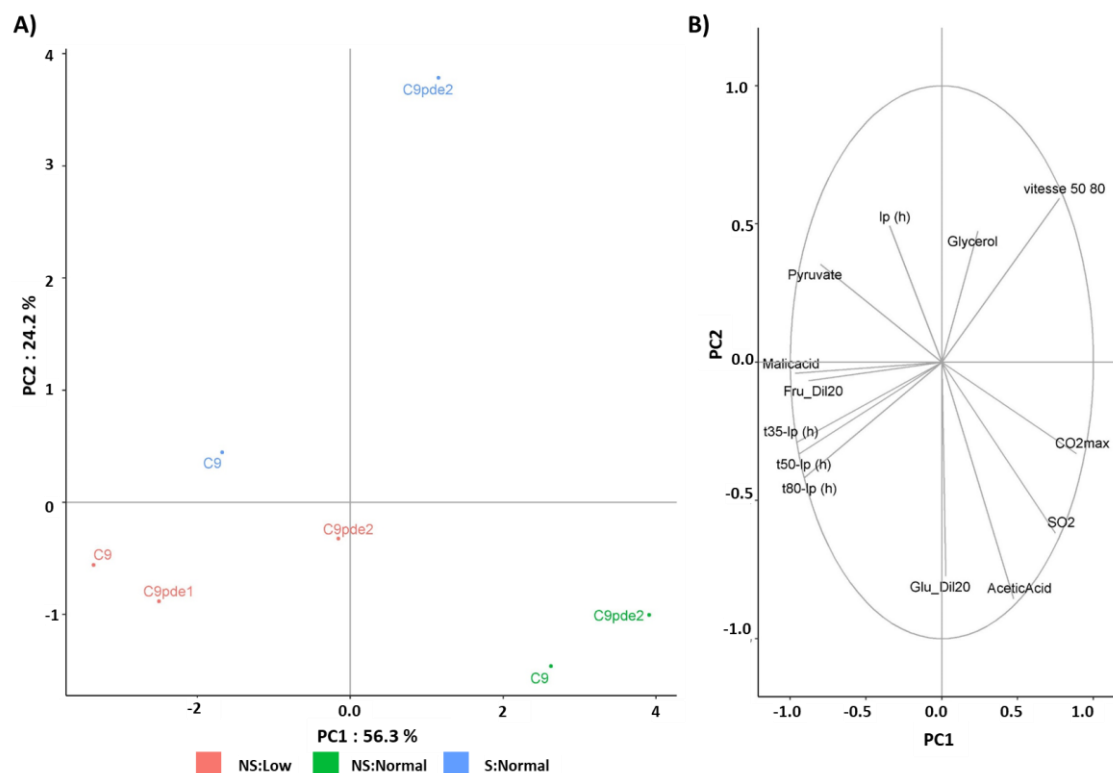
**Figura 112.** Análisis de parámetros cinéticos procedentes de la vinificación en Sauvignon Blanc de los mutantes de delección de la GTPasas Ras1p y Ras2p implicadas en la ruta Ras/cAMP/PKA. Valores en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9 de los mutantes *ras1Δ* y *ras2Δ* en: fase de latencia (lp, h) (A), tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-lp) (B), piruvato (mg/L) (C) y ácido acético (g/L) (D). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

La delección del gen *RAS2* tanto en condiciones NS:Normal, más similares a las condiciones de vinificación industrial, como en NS:Low presenta una capacidad fermentativa reducida y un acumulación de piruvato y ácido acético que no se observa en el mutante *ras1Δ*. Estos resultados muestran la implicación de la proteína Ras2p en condiciones de vinificación.

### 3.4. Estudio de las fosfodiesterasas Pde1/Pde2p

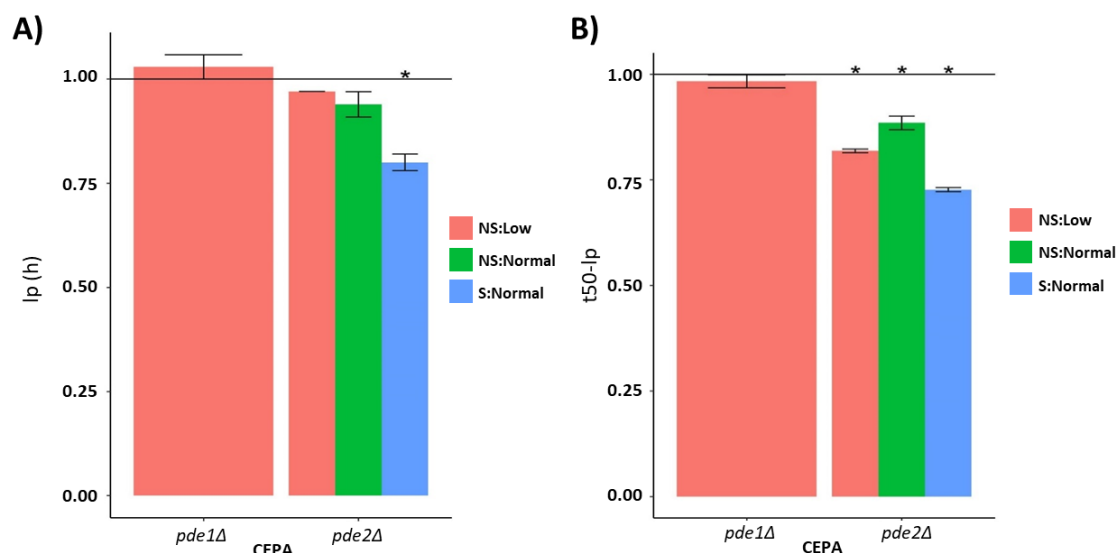
La actividad de PKA está directamente regulada por los niveles de cAMP por lo que la función de las fosfodiesterasas Pde1p y Pde2p, encargadas de su conversión en AMP, es fundamental en el control de la desactivación de la ruta Ras/cAMP/PKA. Las dos fosfodiesterasas se diferencian en su afinidad por el sustrato cAMP, presentando Pde1p baja afinidad y Pde2p alta afinidad (Nikawa et al., 1987; Sass et al., 1986; Wilson y Tatchell, 1988), y sus mutantes de delección presentan sobreacumulación de cAMP en la célula.

Se llevó a cabo un análisis fenómico de los mutantes *pde1Δ* y *pde2Δ* en la cepa C9 en condiciones de vinificación en las siguientes condiciones: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:*Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos (Ip, t35/50/80-Ip, v50\_80) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa. *A priori*, el fenotipo observado debería ser similar a la delección de *CDC25*, es decir, fenotipo característico de una actividad PKA aumentada. Debido a problemas técnicos el mutante *pde1Δ* únicamente se analizó en la condición NS:Low. En el panel A de la Figura 113 se muestra el análisis de componentes principales de los mutantes analizados con su respectiva cepa silvestre C9 así como el círculo de correlación de los parámetros analizados en el panel B de la misma figura. Ambas fosfodiesterasas presentan fenotipos similares en condiciones NS:Low, agrupándose con la cepa silvestre C9 en el mismo cuadrante, si bien el mutante *pde2Δ* se separa algo más. En condiciones de concentración de nitrógeno normal solo se dispone de datos del mutante *pde2Δ*, que también agrupa en el mismo cuadrante que la cepa silvestre C9 en condiciones sin agitación (NS:Normal, color verde), mientras que se separa claramente de ella en condiciones de agitación (S:Normal). El PCA observado en el panel A recoge el 80 % de la variación observada en nuestros datos lo que es consistente con lo observado en el círculo de correlación, ya que la mayor parte de los parámetros analizados presentan flechas de longitud elevada, a excepción de la fase de latencia y el glicerol, cuyos resultados apoyan en menor medida la clasificación de las cepas observadas en el PCA. Todos los mutantes son capaces de finalizar la fermentación y no se observan diferencias ni en la glucosa ni en la fructosa residual. Los únicos parámetros que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes *pde1Δ* y *pde2Δ* y la cepa C9 (Figura 114) son la fase de latencia (Ip, panel A) y el tiempo para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> sin tener en cuenta Ip (t50-Ip, panel B). Es de destacar que la delección del gen *PDE2* mejora la eficiencia de la fermentación independientemente de las condiciones analizadas.



**Figura 113.** Análisis global de los mutantes de delección en las fosfodiesterasas Pde1p y Pde2p implicadas en la ruta Ras/cAMP/PKA en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de los mutantes *pde1Δ* y *pde2Δ* (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not *Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, Not *Shaken*:Low, rojo). Parámetros analizados: fase de latencia (*Ip*), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de  $\text{CO}_2\text{max}$  sin tener en cuenta *Ip* (*t35-lp*/*t50-lp*/*t80-lp*), velocidad de producción media de  $\text{CO}_2$  entre el 50 y el 80 % de  $\text{CO}_2\text{max}$  (*vitesse 50 80*), glicerol (*glycerol*), piruvato (*pyruvate*), ácido málico (*malicacid*),  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  máximo teórico),  $\text{SO}_2$  (dióxido de azufre), ácido acético (*aceticacid*) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (*Glu\_Dil20* y *Fru\_Dil20*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

La fosfodiesterasa Pde2p parece jugar un papel limitante en la velocidad de fermentación en todas las condiciones puesto que el mutante *pde2Δ* presenta un menor *t50-lp* (Figura 114 panel B), y de la adaptación al medio en condiciones de agitación ya que el mutante *pde2Δ* presenta menor fase de latencia (panel A). Todo ello indica que una actividad PKA alta es más adecuada para la eficiencia fermentativa en vinificación. Según Park et al., (2005), Pde2p sería la principal fosfodiesterasa que determinaría los niveles de cAMP en fase estacionaria. Por lo tanto, en condiciones de vinificación, donde la mayor parte del consumo de azúcares reductores tiene lugar en fase estacionaria, al eliminar el gen *PDE2* se elevarían los niveles de cAMP que darían lugar a una activación de la ruta PKA, la cual favorecería que los parámetros cinéticos comentados sean menores en el mutante *pde2Δ*.



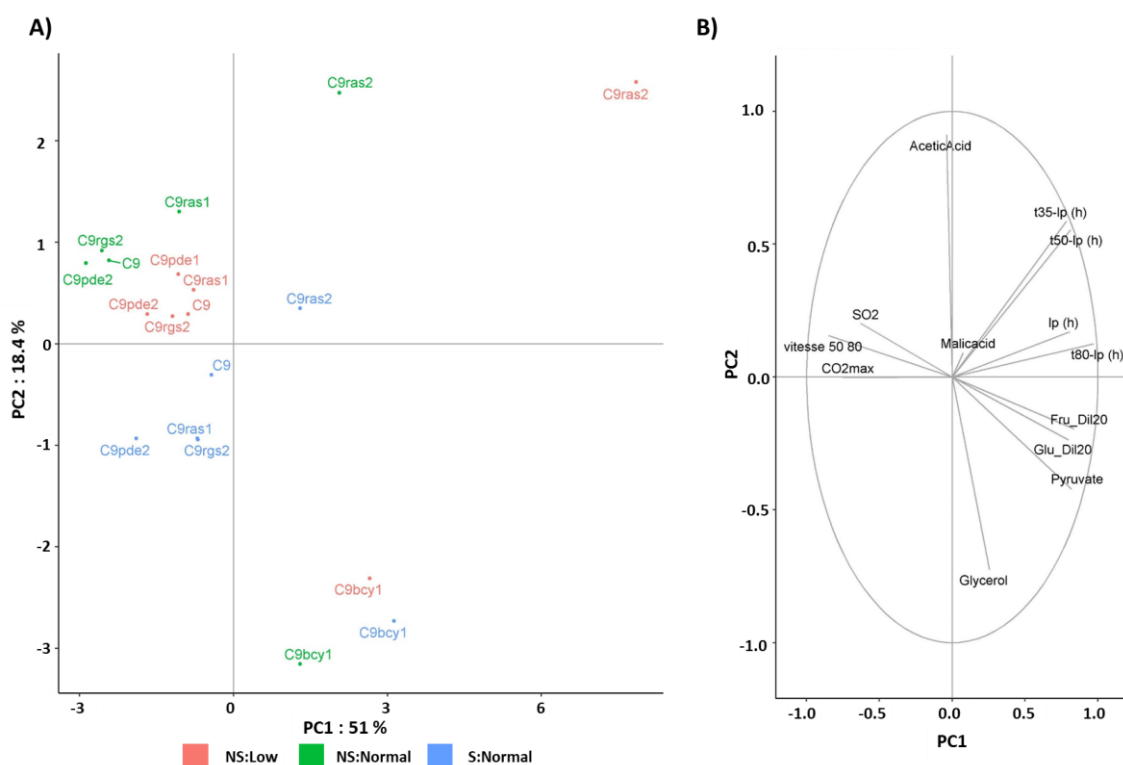
**Figura 114.** Análisis de parámetros cinéticos procedentes de la vinificación en mosto Sauvignon Blanc de los mutantes de delección en la fosfodiesterasas Pde1p y Pde2p implicadas en la ruta Ras/cAMP/PKA. Valores en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9 de los mutantes *pde1Δ* y *pde2Δ* en: fase de latencia (*lp*, h) (A) y tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (*t50-lp*) (B). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas. Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo).

### 3.5. Comparación fenotípica de otros mutantes de delección implicados en la ruta Ras/cAMP/PKA en condiciones de vinificación

Hasta ahora la ruta Ras/cAMP/PKA se ha estudiado mediante mutantes de delección implicados en proteínas que regulan o bien la actividad de la adenilato ciclasa y, por tanto, los niveles de cAMP, o bien directamente los niveles de cAMP con las fosfodiesterasas. A continuación, se delecionó el gen *BCY1* que codifica la subunidad inhibidora de PKA de su actividad proteína quinasa. En condiciones de laboratorio se ha determinado que un mutante *bcy1Δ* no es capaz de utilizar determinadas fuentes de carbono fermentables, presenta defectos en la respiración, no es capaz de almacenar glucógeno, su crecimiento es nulo en condiciones de nitrógeno limitantes y es muy sensible al estrés osmótico (Cannon y Tatchell, 1987, Toda et al., 1987a).

Se llevó a cabo un análisis fenómico en condiciones de vinificación con el *bcy1Δ* en mosto Sauvignon Blanc en las siguientes condiciones: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, NS: *Not Shaken*), agitación nitrógeno normal (S:Normal, S:*Shaken*) y, por último, no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, NS: *Not Shaken*). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos (*lp*, *t35/50/80-lp*, *v50\_80*) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el SO<sub>2</sub>, la glucosa y la fructosa.

Para obtener una visión integrada de los diferentes fenotipos se agruparon los resultados de los demás mutantes de delección implicados en la ruta Ras/cAMP/PKA como *rgs2Δ*, *ras1Δ*, *ras2Δ*, *pde1Δ* y *pde2Δ* junto con el mutante *bcy1Δ* (Figura 115), mostrándose el análisis de componentes principales en el panel A y el círculo de correlación en el panel B. Los mutantes *rgs2Δ*, *pde1Δ*, *pde2Δ* y *ras1Δ* se agruparon con la cepa silvestre en función de las condiciones analizadas. Sin embargo, los mutantes *ras2Δ* y *bcy1Δ* no se agrupan en función de las condiciones sino en función de la delección que presentan. Se observa como el mutante *ras2Δ* en las tres condiciones estudiadas se agrupa en el cuadrante superior derecho mientras que el mutante *bcy1Δ* en el cuadrante inferior derecho. La delección del gen *RAS2* conlleva una reducción en la actividad de la adenilato ciclasa de Cyr1p y, como consecuencia, una reducción de los niveles de cAMP y de la actividad de PKA mientras que la delección de *BCY1* produce una activación constante de PKA, por ello ambos mutantes de delección presentan fenotipos completamente opuestos y se agrupan en el PCA en cuadrantes diferentes. Sin embargo, la delección de las fosfodiesterasas también debería causar una activación de PKA pero no comparte fenotipo con un mutante *bcy1Δ* sugiriendo, probablemente, que son funcionalmente redundantes o bien que existen otros mecanismos que regulen la concentración de cAMP en la célula. Respecto al círculo de correlación (panel B), vuelve a observarse la correlación negativa del ácido acético y del glicerol y la agrupación de los tiempos de liberación de CO<sub>2</sub> (t35-50-80-lp). La flecha tan corta del ácido málico indica que dicho parámetro no apoya completamente la agrupación proporcionada por el PCA.



**Figura 115.** Análisis global de diversos mutantes de delección de proteínas que forman parte de la ruta Ras/cAMP/PKA en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Análisis de componentes principales (PCA) de los triplicados de los mutantes *ras1Δ*, *ras2Δ*, *pde1Δ*, *pde2Δ*, *bcy1Δ*, *rgs2Δ* (A). Gráfico de correlación donde se muestran todos los parámetros, tanto cinéticos como enológicos, medidos durante la fermentación (B). Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo).

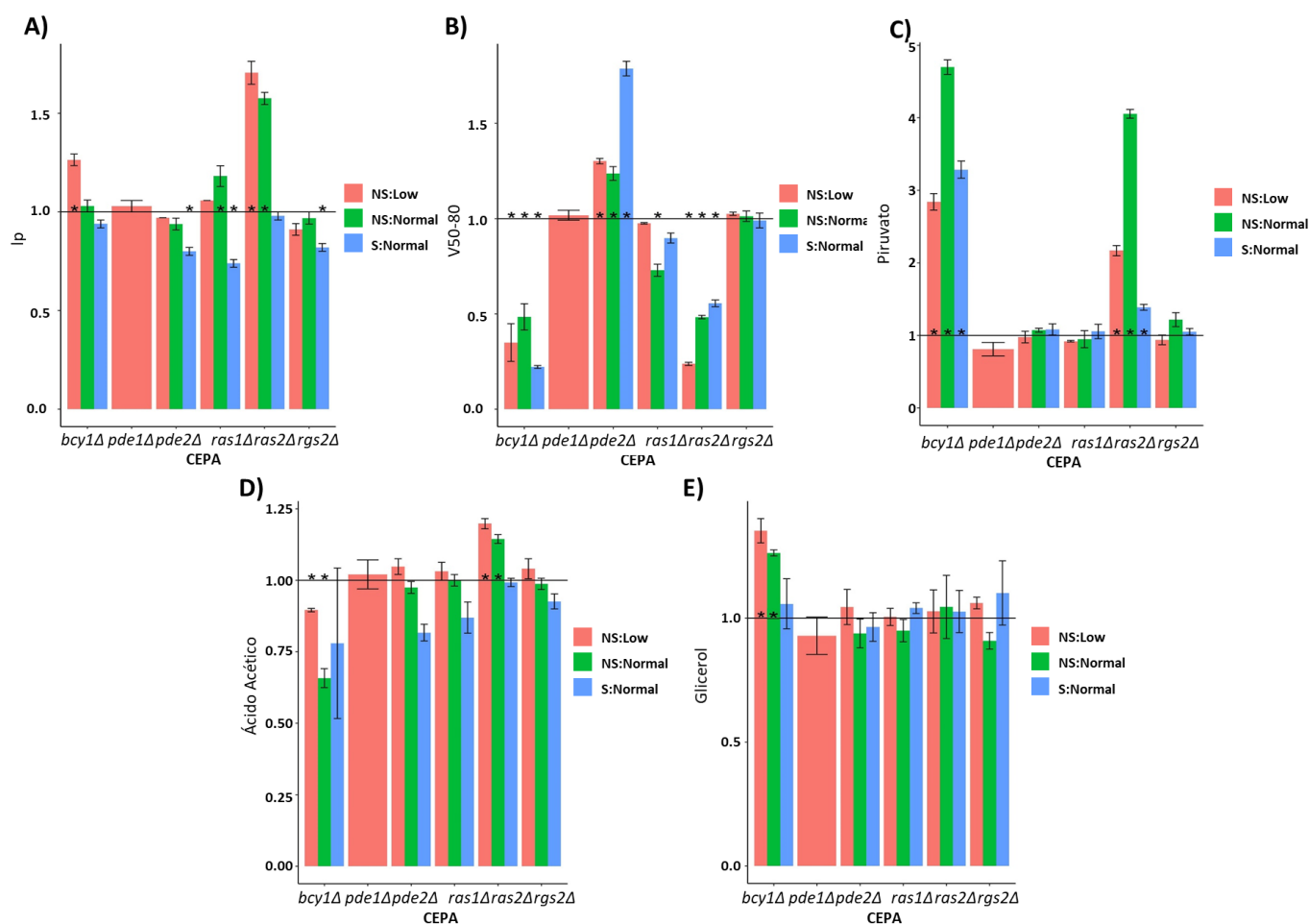
Parámetros analizados: fase de latencia (lp), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta lp (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_Dil20 y Fru\_Dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

---

En lo que se refiere al comportamiento particular del mutante *bcy1Δ*, fue capaz de finalizar la fermentación en condiciones de agitación y disponibilidad normal de nitrógeno (S:Normal) pero no en condiciones sin agitación, independientemente de los niveles de nitrógeno bajos (NS:Low) o normales (NS:Normal). En estas condiciones en las que no finalizó la fermentación, se observó tanto fructosa como glucosa residual. Estos resultados estarían en concordancia con fenotipos descritos previamente para el mutante *bcy1Δ*, cuyo crecimiento es menor en presencia de sacarosa o glicerol como fuente de carbono (Cannon y Tatchell, 1987; Tabera et al., 2006).

Los parámetros tanto cinéticos como enológicos de especial relevancia se muestran en la Figura 116. Tal y como sugieren los datos de la fase de latencia (panel A) y de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80, panel B), el mutante *bcy1Δ* no tiene ningún problema en adaptarse a las condiciones de fermentación. Sin embargo, cuando ha liberado aproximadamente 60 g/L de CO<sub>2</sub>max, su capacidad fermentativa disminuye rápidamente hasta convertirse en prácticamente nula, no pudiendo finalizar la fermentación en ausencia de agitación, ya sea con concentración de nitrógeno normal (NS:Normal) o (NS:Low), indicando que un exceso de actividad PKA durante la fase estacionaria de una vinificación estática es contraproducente. En condiciones NS:Normal, el mutante *bcy1Δ* presenta un nivel de fructosa residual 50 veces mayor y de glucosa 20 veces mayor respecto de la cepa silvestre; mientras que en condiciones NS:Low, el nivel de fructosa residual es únicamente 5 veces mayor y el de glucosa residual es muy similar al de la cepa silvestre. En condiciones S:Normal la reducción de la velocidad de fermentación es menor (v 50 80); sin embargo, no se observan diferencias en el tiempo en liberar el 35 % de CO<sub>2</sub> (t35-lp). Estos datos sugieren que el gen *BCY1* es necesario para la fase estacionaria pero no para la fase de adaptación o exponencial. En dichas condiciones también se observa un nivel de fructosa residual de 5 g/L, pero no se detecta glucosa residual.

De especial interés es la acumulación de piruvato (panel C) tanto en el mutante de delección *bcy1Δ* como en *ras2Δ*, cuando deberían presentar fenotipos opuestos puesto que el estado de activación de PKA es opuesto en los dos mutantes. El mutante *bcy1Δ* presenta una concentración menor de ácido acético (panel D) y una concentración mayor de glicerol (panel E) en condiciones sin agitación, tanto con concentración de nitrógeno limitante (NS:Low) como normal (NS:Normal). El mutante *ras2Δ* presenta mayor acumulación de ácido acético pero no de glicerol.



**Figura 116.** Análisis de parámetros cinéticos procedentes de la vinificación en Sauvignon Blanc de los mutantes de delección de las proteínas que forman parte de la ruta Ras/cAMP/PKA. y Valores en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9 de los mutantes *ras1Δ*, *ras2Δ*, *pde1Δ*, *pde2Δ*, *bcy1Δ*, *rgs2Δ* en la fase de latencia ( $l_p$ ) (A), velocidad de producción media de  $CO_2$  entre el 50 y el 80 % de  $CO_2$ max (B), piruvato (C), ácido acético (D) y glicerol (E), respectivamente. Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas. Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not Shaken: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, Shaken: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, Not Shaken:Low, rojo). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

Es conveniente recordar aquí los resultados obtenidos en los análisis del estado de fosforilación de proteínas de las rutas de señalización de nutrientes mostrados en el capítulo 1 (apartado 4.2), que demuestran que la ruta Ras/cAMP/PKA es la única que se encuentra activa a lo largo de toda la vinificación, lo que sugiere que es la ruta principal que regula a las demás. De hecho, el análisis fenómico muestra que al obtener una actividad elevada de PKA por delección del gen de su subunidad reguladora negativa, *BCY1*, el mutante únicamente presenta problemas cuando la producción de  $CO_2$  sobrepasa los 60 g/L, momento a partir del cual la capacidad fermentativa disminuye. Por tanto, parece que PKA juega un papel importante en condiciones de vinificación en fase estacionaria.

### 3.6. Estudio de las proteínas implicadas en la ruta SNF1

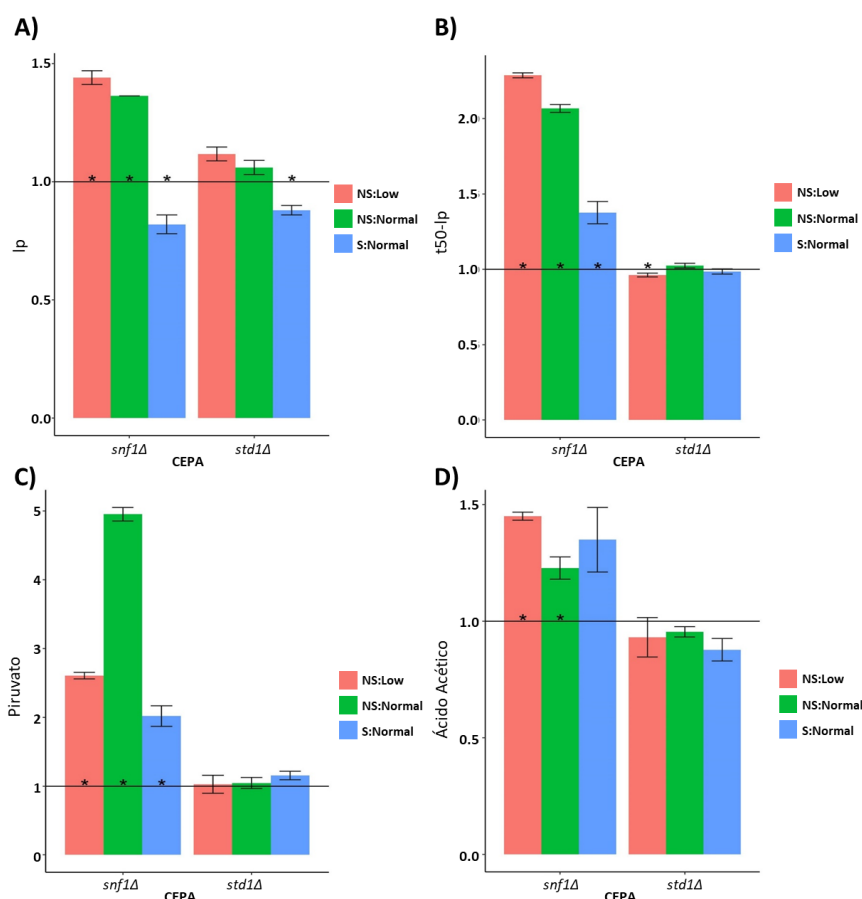
También se llevó a cabo un análisis fenómico de mutantes de delección relacionados con la ruta SNF1, en concreto, de los mutantes *std1Δ* y *snf1Δ*. *S. cerevisiae* presenta diversos mecanismos que permiten la detección y el transporte de la glucosa dentro de la célula. El mecanismo dual de detección de la glucosa está formado por las proteínas de membrana Gpr1p y Snf3p/Rtg2p. Mientras que el receptor Gpr1p está asociado a la adenilato ciclasa y, por tanto, a PKA, el transportador Snf3p/Rtg2p está asociado a la ruta SNF1. La principal diana de Snf3p/Rtg2p es el factor transcripcional Rgt1p a través de la proteína Std1p. Además, participan en el transporte los transportadores de glucosa codificados por los genes *HXTs*.

Un mutante *snf1Δ* no es capaz de inducir los genes necesarios para el uso de fuentes de carbono alternativas a la glucosa por lo que su crecimiento es nulo en sacarosa, glicerol, galactosa y maltosa. Además, presenta una elevada sensibilidad al estrés hiperosmótico y un defecto en la respiración. Resultados procedentes del capítulo 1 (Figura 72, apartado 4.2.4) muestran que Snf1p se encuentra activa desde las primeras horas de la fermentación vínica por lo que el estudio de la delección de *SNF1* en condiciones de vinificación podría ampliar la información sobre la función de Snf1p en dichas condiciones.

En condiciones de baja concentración de glucosa, Rgt1p interacciona con Std1p y Mth1p para inducir la expresión tanto de los transportadores de hexosas de baja y alta afinidad como de *MIG2*, *HXX2* y *MTG2*. Como consecuencia, se expresan los transportadores de hexosas favoreciendo la captación de hexosas como la fructosa o galactosa. Sin embargo, en condiciones donde la glucosa está presente, Rgt1p se fosforila impidiendo su unión a Std1p y Mth1p (Busti et al., 2010; Lakshmanan et al., 2003; Polish et al., 2005). PKA también es capaz de regular la actividad de Rgt1p. Así pues, la expresión de los transportadores de hexosas está conjuntamente regulada a través de la ruta SNF1 por la proteína Std1p (Simpson-Lavy et al., 2017) y por la ruta Ras/cAMP/PKA a través del factor transcripcional Rgt1p. De esta forma, los mutantes *rgt1Δ* y *std1Δ* no serán capaces de inducir la expresión de los transportadores de hexosas cuando los niveles de glucosa sean críticos.

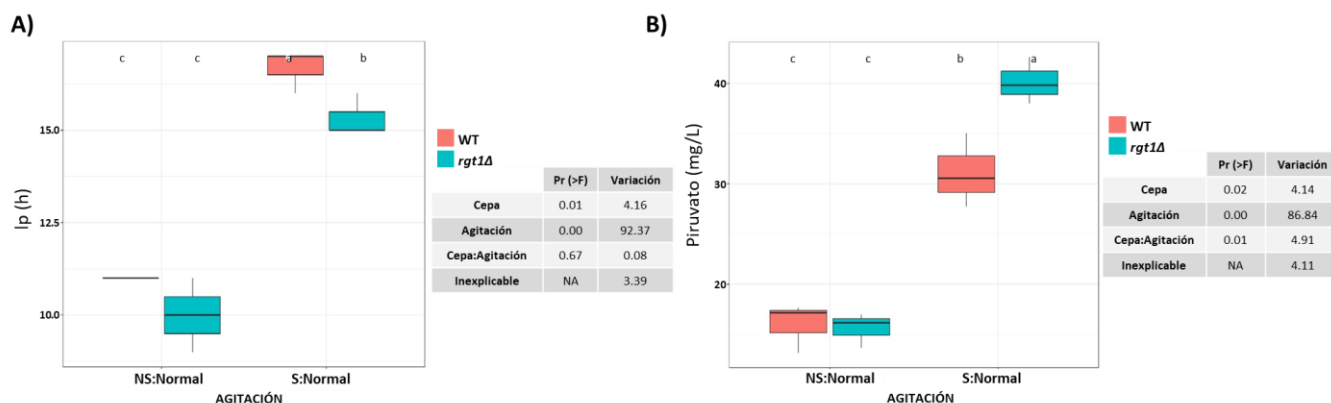
Los resultados de los parámetros tanto cinéticos como enológicos de los mutantes *std1Δ* y *snf1Δ* se muestran en la Figura 117 mediante valores normalizados frente a la cepa silvestre C9. Todos los mutantes analizados son capaces de finalizar la fermentación. Los mutantes *snf1Δ* y *std1Δ* presentan una fase de latencia (panel A) menor en condiciones de agitación (S:Normal, barra azul) pero mayor en condiciones sin agitación, independientemente de la concentración de nitrógeno presente en el medio (NS:Normal o NS:Low, barras verde y roja). Respecto a la velocidad de fermentación, el mutante de delección *snf1Δ* presenta un tiempo mayor para liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t<sub>50-lp</sub>, panel B) en todas las condiciones analizadas, corroborando los resultados del capítulo 1, que Snf1p es necesario para llevar a cabo una correcta fermentación alcohólica. Al igual que el mutante de delección *ras2Δ* (Figura 112 panel C), el mutante *snf1Δ* presenta una acumulación de piruvato (Figura 117 panel C), incluso 5 veces mayor respecto a la cepa silvestre en condiciones NS:Normal. Esa mayor acumulación de piruvato no se traduce completamente a una obtención de ácido acético similar (panel D). No se observan diferencias en t<sub>50-lp</sub> (panel B), en el piruvato (panel C) ni ácido acético (panel D) del mutante *std1Δ* lo que sugiere que *STD1* en condiciones de vinificación no juega un papel importante, quizás porque regula mecanismos de transporte de azúcares no necesarios en presencia de la gran cantidad de azúcares fermentables presente en el mosto.





**Figura 117.** Análisis de parámetros cinéticos y enológicos procedentes de la vinificación en mosto Sauvignon Blanc de los mutantes de delección de proteínas que forman parte de la ruta SNF1. Valores en tanto por 1 respecto de la cepa silvestre C9 de los mutantes *snf1Δ* y *std1Δ* en: Fase de latencia (Ip, h) (A), tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-Ip) (B), piruvato (mg/L) (C), ácido acético (g/L) (D). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas. Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, *Not Shaken*: Normal, verde), agitación nitrógeno normal (S:Normal, *Shaken*: Normal, azul) y no agitación nitrógeno bajo (NS:Low, *Not Shaken*:Low, rojo). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

También se analizó el mutante de delección en el gen *RGT1*, cuya proteína es diana de fosforilación de PKA a través de la ruta Ras/cAMP/PKA. Debido a las limitaciones en el número de cepas analizadas en el análisis fenómico, el mutante *rgt1Δ* únicamente se analizó en NS:Normal y S:Normal para estudiar el efecto de la agitación en los parámetros cinéticos y enológicos, Figura 118. Al analizarse en dos condiciones se optó por la representación mediante diagramas de cajas. Las únicas diferencias estadísticamente significativas observadas entre el mutante *rgt1Δ* y su respectiva cepa silvestre C9 afectan a la fase de latencia (Ip, panel A) y a la concentración de piruvato (panel B). Tal y como puede observarse, la fase de latencia es mayor en condiciones de agitación que en condiciones estáticas; siendo ligeramente menor para el mutante *rgt1Δ* que para la cepa silvestre. La captación de azúcares por los transportadores regulados por Rgt1p no parece ser limitante en condiciones de vinificación.



**Figura 118.** Análisis de parámetros cinéticos y enológicos durante la fermentación alcohólica en mosto Sauvignon Blanc del mutante *rgt1Δ*. Fase de latencia ( $I_p$ , h) (A). Piruvato (mg/L) (B). No agitación nitrógeno normal (NS:Normal) y agitación nitrógeno normal (S:Normal). Los valores mostrados son la media de las tres réplicas realizadas y las barras de error son desviaciones estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. NA: *Not Available*, no disponible. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

### 3.7. Estudio de la respuesta retrógrada. Papel del gen *MKS1*.

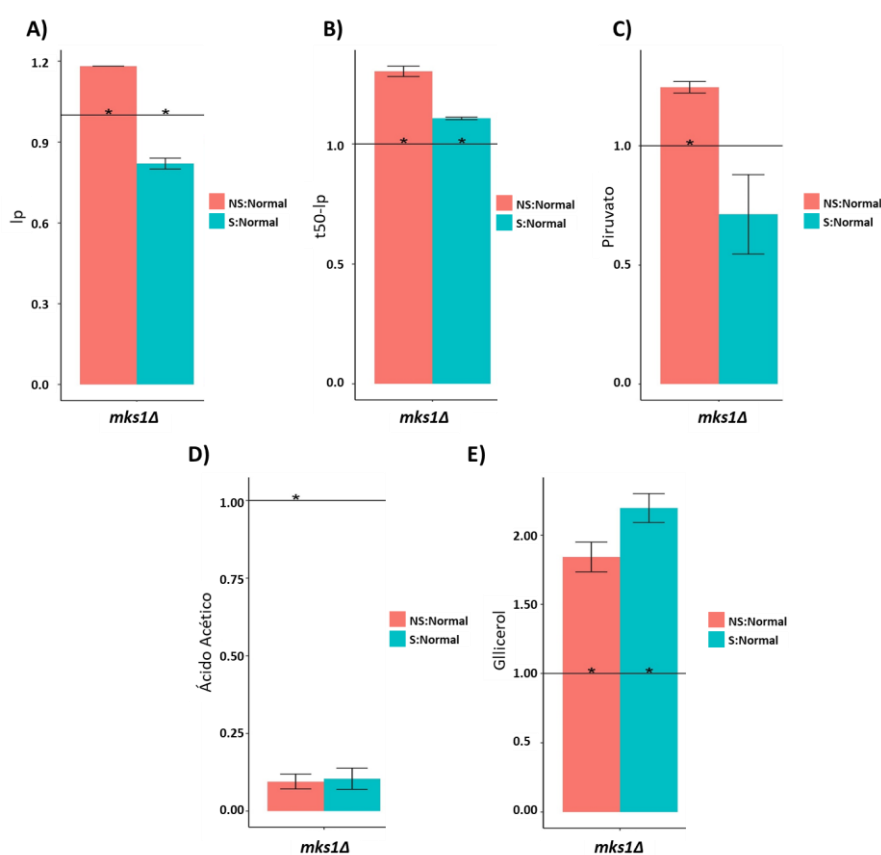
En ayuno de nitrógeno, la respuesta retrógrada (RTG) se induce con el objetivo de reorganizar los compuestos nitrogenados, sin embargo, también puede activarse como consecuencia del daño oxidativo debido a una disfunción mitocondrial. *MKS1* es un regulador negativo de la RTG ya que promueve la fosforilación de Rtg3p, inhibiendo su translocación al núcleo. Por lo tanto, al deletar *MKS1* se consigue una activación constitutiva de la ruta retrógrada. Un mutante deficiente en *MKS1* es más sensible a rapamicina conectando así la ruta RTG con la ruta TOR (Laxman y Tu, 2011).

#### 3.7.1. Análisis fenómico del mutante *mks1Δ* en condiciones de vinificación

Se realizaron dos vinificaciones con el mutante C9 *mks1Δ* en mosto Sauvignon Blanc para estudiar la influencia de Mks1p en vinificación en condiciones de no agitación con nitrógeno normal (NS:Normal) y agitación con nitrógeno normal (S:Normal). El progreso de la fermentación se siguió midiendo la pérdida de peso y los parámetros cinéticos ( $I_p$ ,  $t_{35/50/80-I_p}$ ,  $v_{50/80}$ ) se determinaron a partir de las curvas de crecimiento. Los parámetros enológicos, determinados mediante kits comerciales en una plataforma automatizada, fueron el ácido acético, el glicerol, el ácido málico, el piruvato, el  $SO_2$ , la glucosa y la fructosa. Los resultados de los parámetros más relevantes se muestran en la Figura 119, mostrándose los valores normalizados frente a la cepa silvestre C9. En ambas condiciones, el mutante *mks1Δ* fue capaz de finalizar la fermentación, obteniendo la liberación de  $CO_2$  esperada y no obteniéndose ni glucosa ni fructosa residuales en el sobrenadante de la fermentación. La fase de latencia ( $I_p$ , panel A) es mayor en condiciones de no agitación (NS:Normal) que en condiciones de agitación (S:Normal). Aunque el mutante *mks1Δ* presenta una mejor adaptación al mosto en condiciones de agitación, el tiempo para liberar el 50 % de  $CO_2$  sin tener en cuenta la  $I_p$  ( $t_{50-I_p}$ , Figura 119 panel B) es mayor, también observado para la condición de no agitación, posiblemente debido a una mayor actividad mitocondrial. La concentración de piruvato (panel C) también varía en función de la condición analizada. Mientras que en condiciones de no agitación el piruvato se

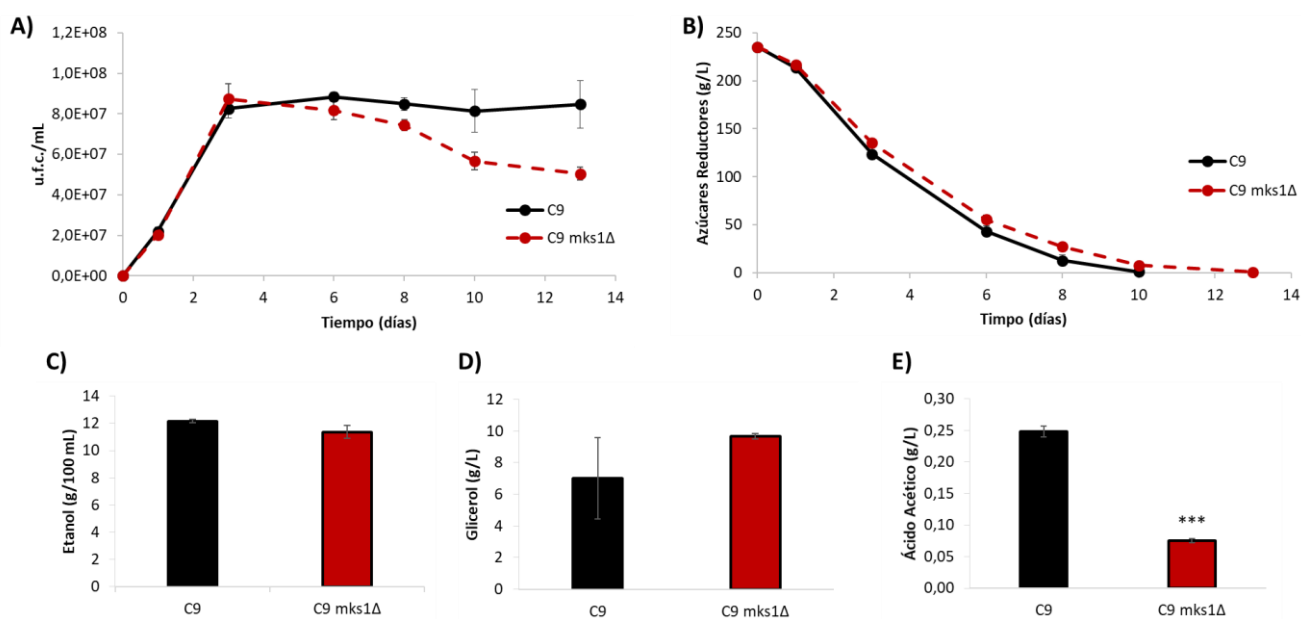
acumula en el mutante *mks1Δ*, en condiciones de agitación el mutante presenta una reducción en los niveles de piruvato.

En la industria enológica, el glicerol tiene importancia por su contribución al cuerpo del vino y, por tanto, es un metabolito deseable en el producto final. Sin embargo, tal y como se ha comentado en la Introducción, una mayor producción de glicerol suele llevar asociada una mayor producción de ácido acético, compuesto no deseable por sus efectos de aumento de la acidez volátil. En el panel E puede observarse como el mutante *mks1Δ* presenta 1.84 y 2.16 veces más glicerol que su respectiva cepa silvestre en condiciones de no agitación y agitación respectivamente. Sin embargo, esa mayor acumulación de glicerol no viene acompañada de una sobreproducción de ácido acético (Figura 119 panel D), como suele ser habitual (Remize et al., 1999). De hecho, en ambas condiciones el mutante *mks1Δ* presenta una considerable reducción del contenido de ácido acético (0.09 y 0.1 en NS:Normal y S:Normal, respectivamente).



**Figura 119.** Efecto de la agitación en el mutante *mks1Δ* en condiciones de vinificación en Sauvignon Blanc. Fase de latencia (Ip, h) (A), tiempo en liberar el 50 % de CO<sub>2</sub> menos la fase de latencia (t50-lp) (B), piruvato (mg/L) (C), el ácido acético (g/L) (D) y el glicerol (g/L) (E). Se muestran valores medios con sus respectivas desviaciones típicas. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas. Condiciones analizadas: no agitación nitrógeno normal (NS:Normal, Not Shaken: Normal, rojo), agitación nitrógeno normal (S:Normal, Shaken: Normal, azul). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

Como consecuencia del fenotipo interesante del mutante *mks1Δ*, se ha analizado de manera alternativa en nuestro laboratorio las vinificaciones de *mks1Δ*, con el fin de confirmar y ampliar su influencia durante la vinificación. Se seleccionó otro tipo de mosto natural (mosto Bobal tinto) y se siguió el progreso de la fermentación por otras vías (midiendo el crecimiento celular y el consumo de azúcares reductores). Esta vinificación permitió determinar si el fenotipo observado era como consecuencia de las condiciones en las cuales se llevaba a cabo la fermentación o debido a la delección del gen *MKS1*. Los resultados de la vinificación se muestran en la Figura 120. El crecimiento del mutante *mks1Δ* (panel A) es muy similar al de su cepa silvestre aunque su pérdida de viabilidad se produce a tiempos más tempranos. Respecto al consumo de azúcares reductores (panel B), su capacidad de completarlo es también muy similar a la de la cepa C9, tardando tres días más en finalizar la fermentación. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la producción de etanol (panel C), pero sí en la de glicerol (panel D) y ácido acético (panel E). Estos resultados ratifican los obtenidos durante el análisis fenómico para condiciones de no agitación (Figura 119). La concentración de glicerol en el mutante *mks1Δ* es mayor que en la cepa silvestre C9, aunque el error en las medidas no permite afirmar que sea estadísticamente significativa. Respecto al ácido acético (panel E), se observa una reducción del 70 % en el mutante *mks1Δ*, ligeramente inferior a la reducción observada para el análisis fenómico (Figura 119 panel D) pero significativa.



**Figura 120.** Vinificación en mosto Bobal del mutante en la proteína Mks1p en la cepa vínica haploide C9. Curvas de crecimiento del mutante *mks1Δ* y de su respectiva cepa silvestre C9 (A). Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación. Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (B). Etanol (g/100 mL) (C), glicerol (g/L) (D) y ácido acético (g/L) (E), determinados al finalizar la fermentación vínica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\*\*\*) P-valor  $\leq 0.005$ .

### 3.7.2. Análisis del efecto de la delección del gen *MKS1* en diferentes cepas

Debido al fenotipo de mayor producción de glicerol sin aumentar la producción de ácido acético del mutante *mks1Δ*, de claro interés enológico, se investigó si ese fenotipo es característica general de las cepas vínicas o un carácter específico del fondo genético de la cepa C9. Para ello, se construyeron los mutantes *mks1Δ* en los fondos genéticos EC1118 y L2056, ambas cepas vínicas diploides comerciales y se procedió a una caracterización completa del fenotipo de los mutantes. En primer lugar, se realizó un análisis de tolerancia a diversos inhibidores químicos y, posteriormente, se realizaron vinificaciones para corroborar los niveles de glicerol y ácido acético obtenidos para la cepa C9.

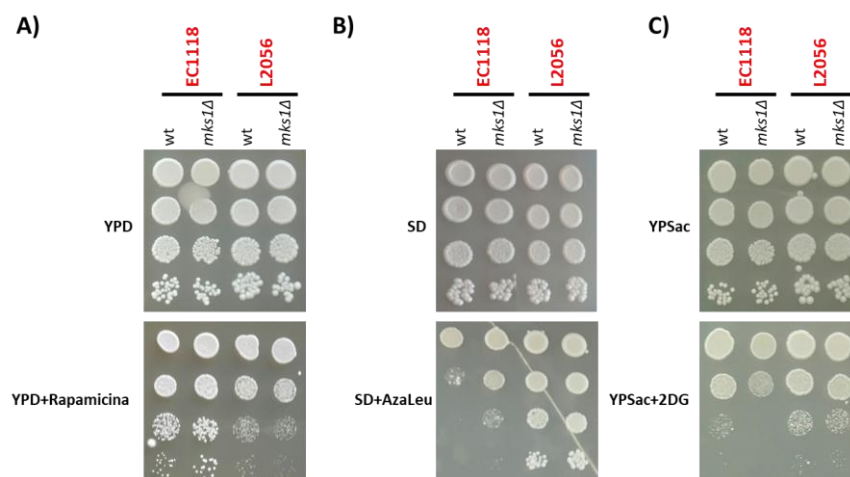
#### 3.7.2.1. Tolerancia a inhibidores químicos del mutante *mks1Δ*

La tolerancia a rapamicina de los mutantes *mks1Δ* se ha descrito como variable en función del fondo genético, siendo más tolerante en la cepa S288c (Huber et al., 2009) y más sensible en los fondos genéticos CEN.PK y Σ1278 (Laxman y Tu, 2011). La tolerancia a diversos inhibidores químicos de los mutantes *mks1Δ* en los fondos genéticos EC1118 y L2056 se muestra en la Figura 121, donde se observa que el mutante EC1118 *mks1Δ* es igual de resistente a la rapamicina (panel A) que su cepa silvestre, mientras que el mutante L2056 *mks1Δ* es ligeramente más sensible.

Al inhibir TORC1, la rapamicina induce la activación de la ruta RTG (Komeili et al., 2000). Según Dilova et al., (2004, 2002), TORC1 regula la ruta RTG a través de la fosforilación del factor Mks1p. Estos trabajos sugieren que, debido a que Mks1p presenta diferentes estados de fosforilación, la ruta RTG puede encontrarse totalmente inducida o reprimida, o parcialmente activada o inactivada cuando el estado de fosforilación de Mks1p es intermedio. Esa fluctuación en el estado de activación de la RTG podría explicar las diferencias observadas en los mutantes *mks1Δ* en función de la cepa analizada.

En el panel B de la Figura 121 se muestra la sensibilidad de los mutantes a L-azaleucina (azaLeu), análogo estructural de la leucina, que resulta ser menor para la cepa L2056, incluido su mutante *mks1Δ*. Estos resultados sugieren que la cepa EC1118, al ser más sensible a azaLeu, requiere un mayor transporte de leucina.

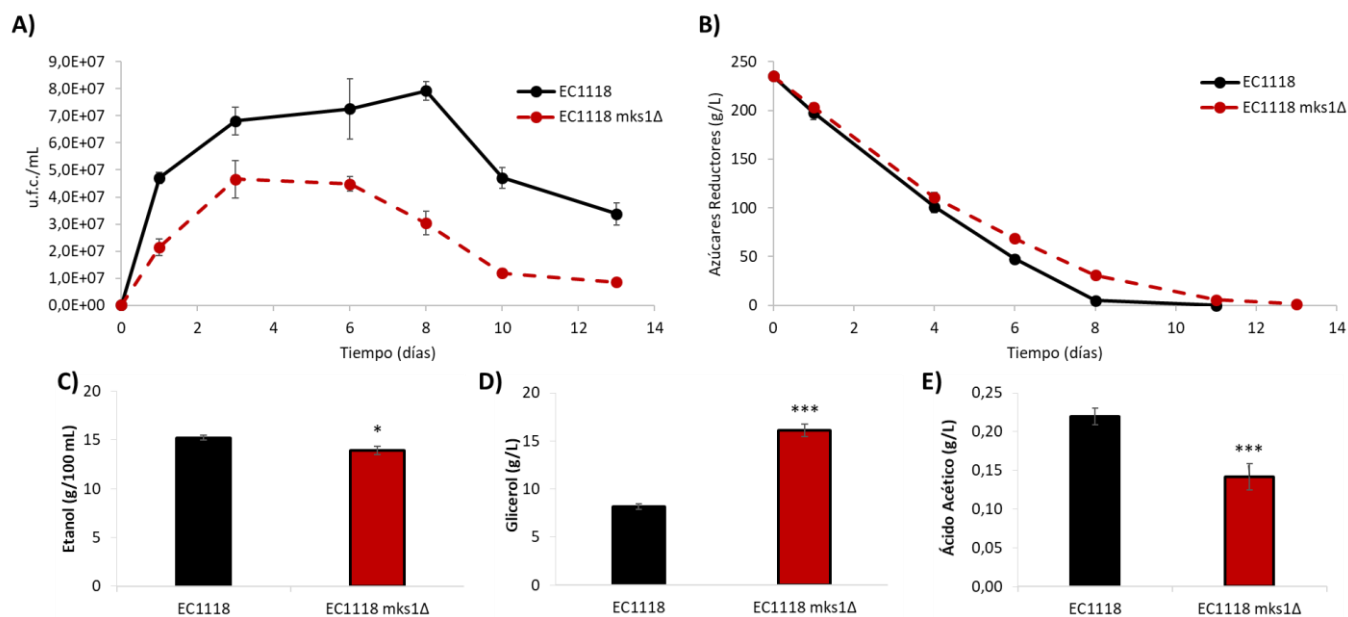
Los fenotipos de tolerancia a 2-desoxiglucosa observados son contrarios a los observados frente a rapamicina y cafeína. Mientras que el mutante EC1118 *mks1Δ* es más sensible a 2DG, el mutante L2056 *mks1Δ* presenta la misma tolerancia que su cepa silvestre, Figura 121 panel C.



**Figura 121.** Análisis de crecimiento de mutantes *mks1Δ* frente a diversos inhibidores químicos. Goteos en placa en medio completo YPD con rapamicina (100 nM) (A). Goteos en placa en medio mínimo SD con L-azaleucina (azaLeu, 250 mg/L) (B). Goteos en placa en medio con sacarosa como fuente de carbono con 2-desoxiglucosa (2DG, 200  $\mu$ g/mL) (C). Rojo; cepas vínicas.

### 3.7.2.2. Análisis del mutante *mks1Δ* en condiciones de vinificación

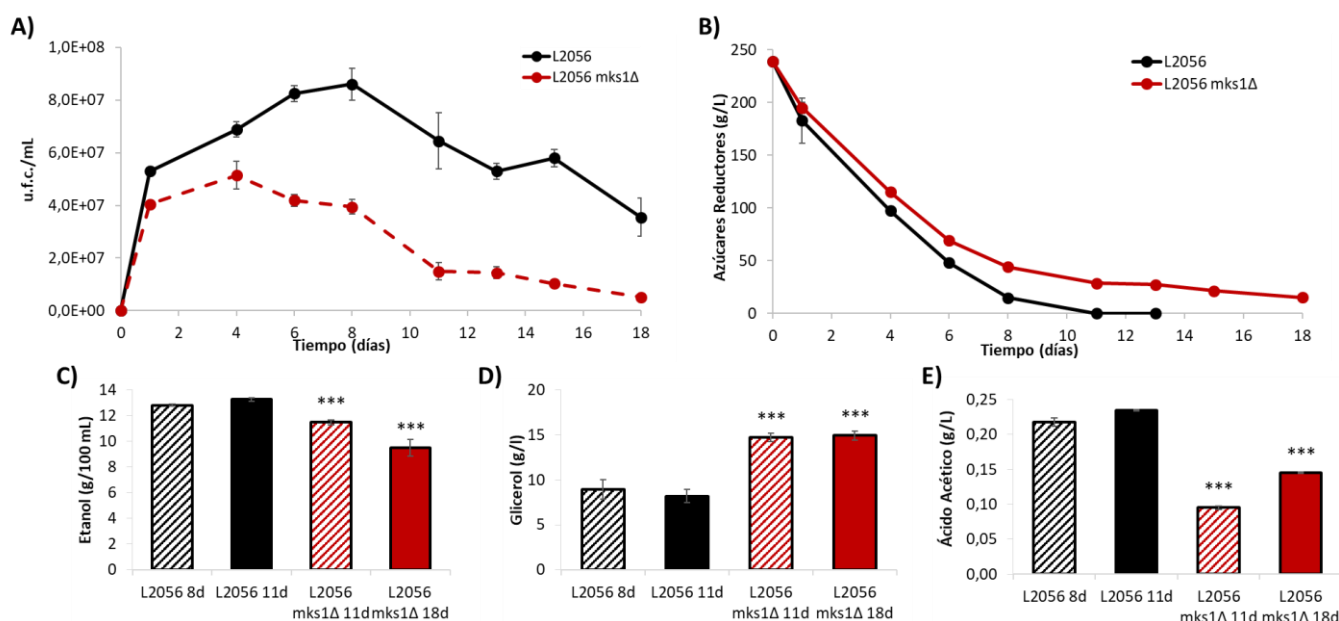
En la Figura 122 se muestran los datos obtenidos de la vinificación de la cepa EC1118 y su respectivo mutante EC1118 *mks1Δ* en las mismas condiciones que se muestran en la Figura 120 para la cepa C9. El mutante EC1118 *mks1Δ* presenta un defecto en el crecimiento que se traduce en un menor número de u.f.c./mL (panel A). Respecto a la capacidad de consumir los azúcares presentes en el mosto se observa que, al igual que en el fondo C9, el mutante tarda dos días más en finalizar la fermentación (< 2 g/L azúcares reductores, panel B). Mientras que en la cepa C9 no se observaron diferencias en el contenido alcohólico del sobrenadante de la fermentación alcohólica (panel C), el mutante EC1118 *mks1Δ* sí que presenta una reducción de la producción de etanol (0.91 en tanto por 1) (panel C). Se confirma, al igual que para la cepa C9 (paneles D y E), una mayor acumulación de glicerol (panel D) y una disminución de ácido acético (panel E), en ambos casos estadísticamente significativas.



**Figura 122.** Efecto de la delección del gen *MKS1* en la cepa vínica diploide EC1118 en condiciones de vinificación en mosto variedad Bobal. Curvas de crecimiento del mutante *mks1Δ* (línea roja discontinua) y de su cepa silvestre EC1118 (línea negra continua) (A). Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación. Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (B), etanol (g/L100 mL) (C), glicerol (g/L) (D) y ácido acético (g/L) (E), determinados al finalizar la fermentación vínica. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ).

En la Figura 123 se observan los resultados obtenidos durante la vinificación con la cepa L2056 y el mutante L2056 *mks1Δ*. Así como los mutantes construidos en las cepas C9 y EC1118 fueron capaces de finalizar la fermentación, el mutante L2056 *mks1Δ* no es capaz de consumir los azúcares presentes en el mosto (panel B), dejando una concentración residual de 15.14 g/L de azúcares reductores. Por ello, los parámetros enológicos se han determinado para la cepa L2056 a tiempo 8 días, tiempo en el que presenta una concentración de azúcares reductores similar al tiempo más largo medido para el mutante L2056 *mks1Δ*, y a 11 días, tiempo en el que finaliza la fermentación; mientras que para el mutante L2056 *mks1Δ* se han determinado a 11 días, coincidiendo con el tiempo de finalización para la cepa L2056, y a 18 días, último día de recogida de muestra.

Independientemente del tiempo seleccionado para la determinación de etanol, el mutante L2056 *mks1Δ* presenta una concentración menor (Figura 123 panel C). Por lo tanto, la capacidad fermentativa del mutante es menor respecto a su cepa silvestre probablemente porque el número de u.f.c./mL es menor (panel A), no es capaz de consumir todos los azúcares presentes y produce una concentración de etanol menor. Respecto al glicerol (panel D), a tiempo 11 días el mutante *mks1Δ* presenta una acumulación 1.8 veces mayor, mientras que la comparación a tiempo 8 días para L2056 y tiempo 18 días para L2056 *mks1Δ* es de 1.67 veces mayor. Finalmente, la concentración de ácido acético presenta una reducción de casi la mitad en el mutante L2056 *mks1Δ* (panel E).



**Figura 123.** Vinificación en mosto Bobal de mutante en la proteína Mks1p en la cepa vínica L2056. Curvas de crecimiento del mutante *mks1Δ* (línea roja discontinua) y de su cepa silvestre L2056 (línea negra continua). Se representan las unidades formadoras de colonia por mL (u.f.c./mL) a distintos tiempos de fermentación (A). Consumo de azúcares reductores (g/L) durante el proceso de fermentación (B), etanol (g/L100 mL) (C), glicerol (g/L) (D) y ácido acético (g/L) (E), determinados a tiempo 8 y 11 días para L2056 y a tiempos 11 días y 18 días para la cepa mutante. Se muestran valores medios y sus desviaciones típicas. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se indica con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas de la media entre la cepa silvestre y los mutantes (\* P-valor  $\leq 0.05$ ; \*\* P-valor  $\leq 0.01$ ; \*\*\* P-valor  $\leq 0.005$ ).

Aunque el defecto de crecimiento del mutante C9 *mks1Δ* se observa más tardíamente (Figura 120), para los demás fondos genéticos analizados (L2056 y EC1118) el defecto de crecimiento se hace patente desde el primer día de vinificación (Figura 122 y Figura 123), indicando la relevancia de la ruta RTG en condiciones de vinificación. En los tres fondos genéticos, la delección de *MKS1* presenta un retraso en el consumo de azúcares reductores, una mayor acumulación de glicerol y una reducción de la producción de ácido acético.

En condiciones de vinificación, principalmente fermentativas, no es de esperar que la ruta RTG esté activa, sin embargo, es posible que la escasez de nitrógeno produzca su activación para proporcionar intermediarios nitrogenados a la célula. La activación de la ruta RTG y la respuesta a la pérdida de funcionalidad mitocondrial inducen la expresión de genes peroxisomales (Chelstowska y Butow, 1995; Epstein et al., 2001). No obstante, tal y como se muestra en la Figura 78, un mutante *pex12Δ* no presenta fenotipo distintivo en condiciones de vinificación sugiriendo que la ruta RTG no estaría totalmente activa en condiciones de vinificación. La delección de *MKS1* y, como consecuencia, la activación de la ruta RTG, sí que produce un defecto de crecimiento y un cambio en los metabolitos de interés enológico. El menor crecimiento observado del mutante *mks1Δ* sugiere que la activación de la ruta RTG tiene un efecto negativo en condiciones de vinificación, en concordancia con datos previos de nuestro laboratorio (Picazo et al., 2015).



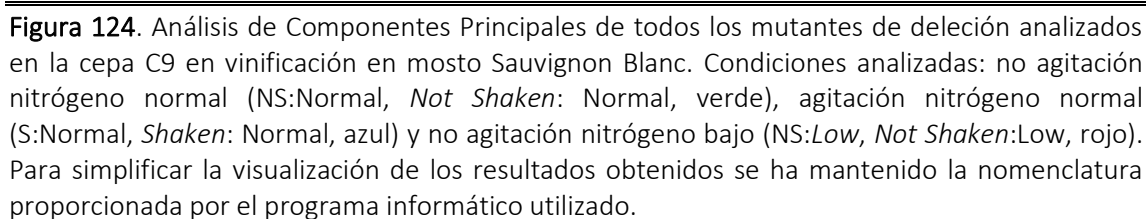
Las diferencias observadas en la tolerancia a inhibidores químicos de los mutantes *mks1Δ* (Figura 121) son dependientes de cepa. Dilova y Powers (2006) demostraron que la defosforilación de Rtg3p es una respuesta inicial mientras que la hiperfosforilación de Rtg3p, como consecuencia del tratamiento con rapamicina, es también dependiente de cepa y del medio de cultivo. Por lo tanto, no es extraño que el mutante *mks1Δ* muestre diferencias de fenotipo en distintas cepas vínicas, probablemente reflejo de regulación diferencial entre ellas.

El aumento de la acumulación de glicerol y la disminución de ácido acético son características enológicas de interés para aumentar el cuerpo del vino y disminuir su acidez volátil. Además, la tendencia actual es el consumo de vinos con menor contenido alcohólico, característica que también cumplen ciertos mutantes *mks1Δ*. Sin embargo, los trámites necesarios para utilizar un organismo modificado genéticamente (OGM) en la Unión Europea son arduos y, seguramente, el producto etiquetado como transgénico no se venderá. Esta sentencia reduce la posibilidad de utilizar un mutante *mks1Δ* en vinificación. No obstante, amplía el conocimiento sobre las rutas de señalización implicadas en condiciones de vinificación y deja patente la importancia de la regulación metabólica para hacer frente a las condiciones adversas.

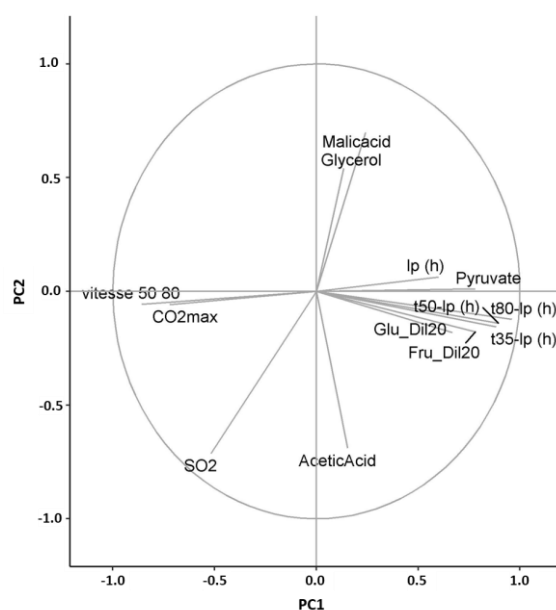
### 3.8. Integración de los fenotipos de distintos mutantes de señalización de nutrientes en la cepa C9

En la Figura 124 se muestra el análisis de componentes principales de todos los mutantes de delección construidos en la cepa silvestre C9 y analizados en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Puede observarse que la mayor parte de los mutantes se agrupan en función de las condiciones analizadas, siendo destacables aquellos que se alejan más de las agrupaciones, como por ejemplo, *bcy1Δ*, *ras2Δ*, *mks1Δ*, *snf1Δ* y *gat1Δgln3Δ*.

Por lo general, las proteínas Ras se asocian tanto a la detección de la glucosa presente en el medio como a la activación de la proteína quinasa PKA. Sin embargo, tal y como se observa en el PCA, el mutante *ras2Δ* presenta un fenotipo ampliamente diferenciado en condiciones de ayuno de nitrógeno (NS:Low), rompiendo la asociación tradicional de la ruta Ras/cAMP/PKA únicamente con la fuente de carbono. Resultados similares se observan con el mutante *snf1Δ*, relacionado con la represión por glucosa y, por tanto, con la captación de fuentes de carbono alternativas. Sin embargo, se observa un fenotipo diferencial más acusado cuando la concentración de nitrógeno es limitante. También cabe destacar la separación del mutante *mks1Δ* en las dos condiciones analizadas debido a la elevada concentración de glicerol y baja concentración de ácido acético de dicho mutante, ya comentadas. El doble mutante *gat1Δgln3Δ* también se separa de los demás mutantes analizados, debido a que no es capaz de finalizar la fermentación en condiciones limitantes de nitrógeno y, como consecuencia, tanto los parámetros enológicos como cinéticos se ven modificados. Esta visión global elimina por completo la idea de que una ruta de señalización únicamente está especializada en detectar, señalar y responder a un único nutriente presente en el medio.



235

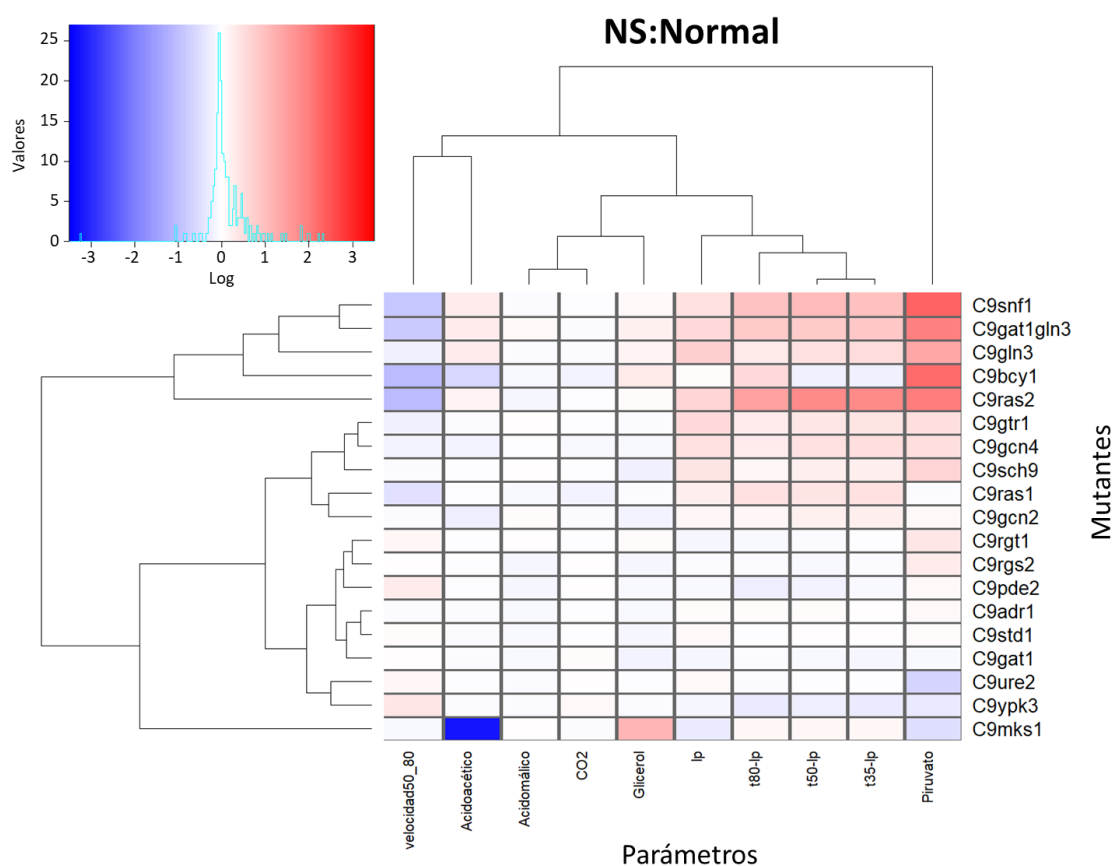


**Figura 125.** Círculo de correlación donde se muestra la relación entre las variables tanto cinéticas como enológicas analizadas en todos los mutantes de delección en la cepa C9 en vinificación en mosto Sauvignon Blanc. Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado. Parámetros analizados: fase de latencia (lp), tiempo para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>max sin tener en cuenta lp (t35/50/80-lp), velocidad de producción media de CO<sub>2</sub> entre el 50 y el 80 % de CO<sub>2</sub>max (vitesse 50 80), glicerol (glycerol), piruvato (pyruvate), ácido málico (malicacid), CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>máximo teórico), SO<sub>2</sub> (dióxido de azufre), ácido acético (aceticacid) y glucosa y fructosa de la muestra diluida 20 veces (Glu\_Dil20 y Fru\_Dil20). Para simplificar la visualización de los resultados obtenidos se ha mantenido la nomenclatura proporcionada por el programa informático utilizado.

Para analizar cómo influyen las condiciones seleccionadas de las vinificaciones realizadas en los fenotipos de los mutantes estudiados, se realizó un análisis comparativo de los parámetros cinéticos y enológicos de todos los mutantes de delección construidos en la cepa C9 obtenidos durante los análisis fenómicos. Los resultados se muestran en forma de mapas de calor (Figura 126, Figura 127 y Figura 128), uno por cada condición analizada. Los datos representados son los valores normalizados frente a la cepa silvestre (C9) para cada uno de los parámetros en escala logarítmica (en base 2), de esta forma, el peso de todos los parámetros es el mismo. Los parámetros cuyo valor es mayor que la cepa silvestre son positivos (rojo) y aquellos valores menores se representan en negativo (azul) mientras que los valores iguales a la cepa silvestre se representan en blanco. Los dendrogramas se calculan en base a la distancia euclídea, de manera que el efecto de todos los parámetros es el mismo. La escala de color indica el número de datos que presentan el valor numérico correspondiente. Debido a que todos los mutantes de delección construidos en la cepa C9 presentaban valores muy similares de SO<sub>2</sub>, se eliminó este parámetro de los mapas de calor.

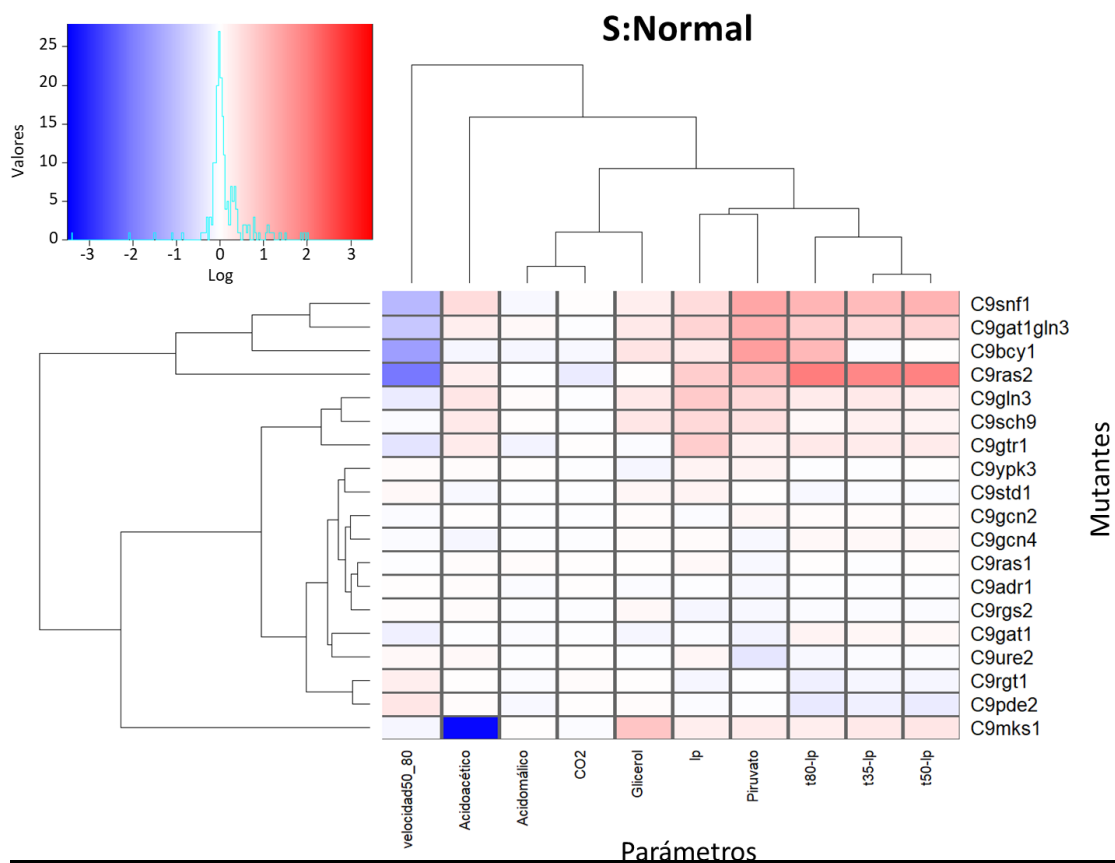
En la Figura 126 se muestra el mapa de calor de la condición de no agitación y nitrógeno normal (NS:Normal), la condición considerada como de referencia. El dendrograma de las cepas muestra la agrupación realizada de las cepas analizadas. Se observan tres grupos: los mutantes *snf1Δ*, *gat1Δgln3Δ*, *gln3Δ*, *bcy1Δ* y *ras2Δ*; el mutante *mks1Δ*; y el resto de mutantes de delección analizados. El primer grupo se caracteriza por una cierta acumulación de piruvato y un aumento en los parámetros cinéticos determinados, el segundo grupo conformado por *mks1Δ* se caracteriza por esa acumulación de glicerol y reducción de ácido acético comentada anteriormente (Figura 120, Figura 122 y Figura 123), y el tercer grupo puede definirse como un intermedio entre los otros dos grupos comentados donde las diferencias en los parámetros analizados no son tan elevadas como en los dos grupos anteriores. El impacto más drástico en los parámetros analizados se produce en los mutantes *snf1Δ*, *gat1Δgln3Δ*, *gln3Δ*, *bcy1Δ* y *ras2Δ*. Las proteínas analizadas a través de estos mutantes de delección están implicadas en las principales rutas de señalización de nutrientes: *snf1Δ* con la ruta SNF1; *gat1Δgln3Δ* y *gln3Δ* con la represión catabólica por nitrógeno; y *bcy1Δ* y *ras2Δ* con la ruta Ras/cAMP/PKA. El fenotipo compartido de estos mutantes de delección implica un mecanismo de compensación similar, independientemente de la ruta de señalización implicada. Respecto a los parámetros cinéticos y enológicos, la agrupación observada coincide con el círculo de correlación observado en la Figura 125. Los tiempos de liberación de CO<sub>2</sub> (t35-lp, t50-lp y t80-lp) se agrupan conjuntamente y, a su vez, todos ellos se agrupan con la fase de latencia.

Cabe destacar que el doble mutante *gat1Δgln3Δ* se agrupa con el mutante *gln3Δ* y no con *gat1Δ*, sugiriendo que el factor transcripcional Gln3p juega un papel importante en condiciones de vinificación y que el efecto de la delección del otro factor transcripcional tipo GATA Gat1p es menor, tal y como se ha observado a lo largo del capítulo. La agrupación de *snf1Δ* con *gat1Δgln3Δ* sugiere que la fosforilación de Gln3p por Snf1p puede ser determinante en la regulación de la vinificación. La agrupación de *ras1Δ* y *ras2Δ* no es continua corroborando la implicación de Ras2p en condiciones de vinificación pero no de Ras1p, ya que la primera se agrupa con los mutantes de delección de proteínas principales de las rutas de señalización de nutrientes y Ras1p con la proteína quinasa Gcn2p, perteneciente al control general de aminoácidos.



**Figura 126.** Análisis comparativo de los parámetros cinéticos y enológicos determinados en los mutantes de delección de proteínas clave en las rutas de señalización de nutrientes en crecimiento en mosto Sauvignon Blanc en condiciones de no agitación y mosto suplementado (NS:Normal). Se representa el logaritmo en base 2 de los datos normalizados frente a la cepa de referencia C9 para cada uno de los parámetros analizados. El color rojo y el azul indican el grado en el que el parámetro observado está por encima o por debajo de la cepa control respectivamente. El agrupamiento tanto de los mutantes como de los parámetros se obtuvo mediante distancia euclídea.

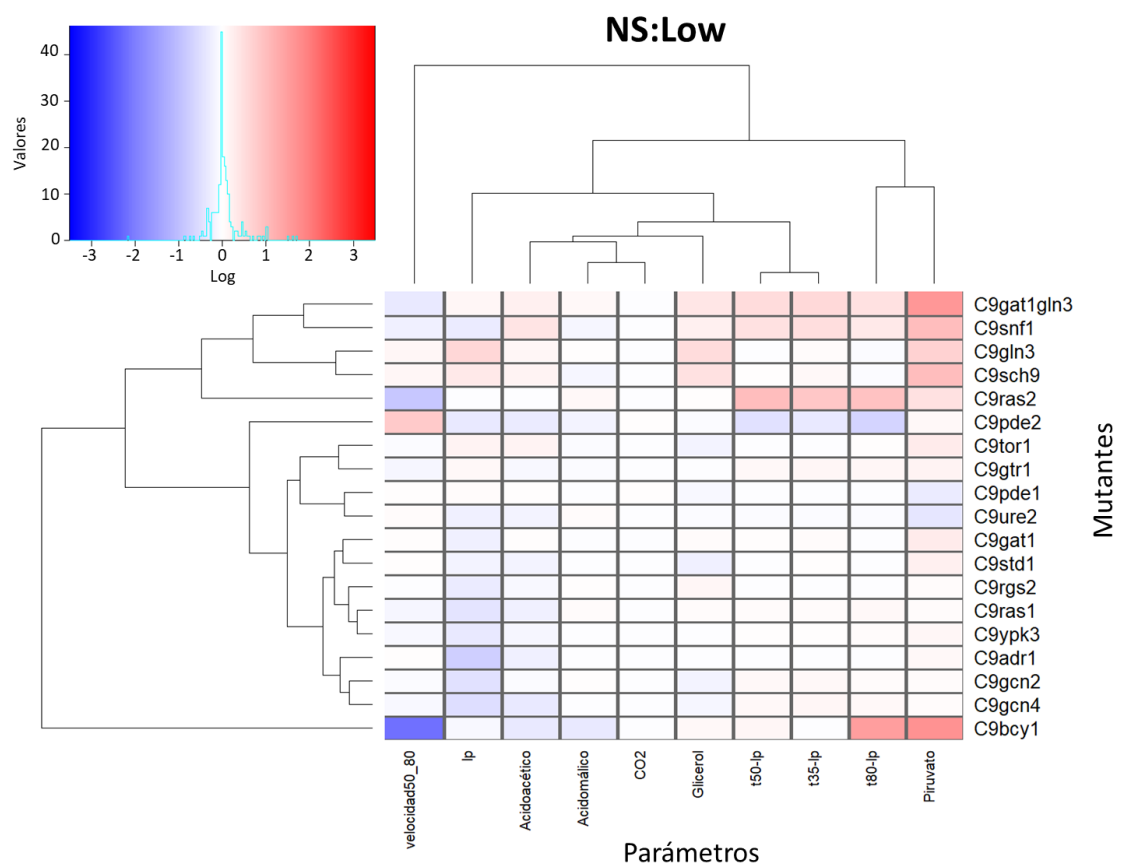
En la Figura 127 se muestra el mapa de calor correspondiente a la condición S:Normal. La agrupación de las cepas y de los parámetros es muy similar a NS:Normal, con algunos parámetros y mutantes de delección a resaltar. Se sigue observando la agrupación de *snf1Δ* con *gat1Δgln3Δ*, *bcy1Δ* y *ras2Δ* pero el mutante *gln3Δ* queda fuera de este grupo debido a que los cambios producidos en los parámetros cinéticos y enológicos no son tan elevados. Es posible que con mayor oxigenación la contribución de Gat1p sea más determinante. También se observa la acumulación de glicerol y la reducción de ácido acético del mutante *mks1Δ*. La proteína quinasa Sch9p y el activador transcripcional Gln3p se agrupan conjuntamente pues su delección causa un fenotipo similar; a diferencia de lo observado en NS:Normal donde *sch9Δ* se agrupaba con *gcn4Δ* y *gtr1Δ*. El dendrograma de los parámetros varía respecto a la condición de no agitación (Figura 126). La fase de latencia (lp) se agrupa junto con el piruvato y ambos con los tiempos de liberación de CO<sub>2</sub>; mientras que en condiciones de no agitación el piruvato no se agrupaba con ningún otro parámetro analizado.



**Figura 127.** Análisis comparativo de los parámetros cinéticos y enológicos determinados en los mutantes de delección de proteínas clave en las rutas de señalización de nutrientes en crecimiento en mosto Sauvignon Blanc en condiciones de no agitación y mosto suplementado (NS:Normal). Se representa el logaritmo en base 2 de los datos normalizados frente a la cepa de referencia C9 para cada uno de los parámetros analizados. El color rojo y azul indican el grado en el que el parámetro observado está por encima o por debajo de la cepa control respectivamente. El agrupamiento tanto de los mutantes como de los parámetros se obtuvo mediante distancia euclídea.

En la Figura 128 se muestra el mapa de calor para la condición NS:Low, la cual se caracteriza por una concentración de nitrógeno baja. Al igual que en las dos condiciones anteriores, los perfiles obtenidos se pueden clasificar en tres grupos. El primer grupo está formado por *sch9Δ*, *gat1Δgln3Δ*, *snf1Δ*, *gln3Δ* y *ras2Δ*; el segundo grupo formado por el mutante *bcy1Δ*; y el último, conformado por el resto de los mutantes de delección. El mutante *sch9Δ* se une a la agrupación de los mutantes *gat1Δgln3Δ*, *snf1Δ*, *gln3Δ* y *ras2Δ* que se ha mantenido en las dos condiciones previas. El dendrograma observado para los mutantes de delección muestra una agrupación única para el mutante *bcy1Δ* puesto que no es capaz de finalizar la fermentación (fructosa y glucosa residual) pero sí es capaz de liberar hasta 60 g/L de CO<sub>2</sub>. A diferencia de las dos condiciones anteriores donde la fase de latencia se agrupaba con los tiempos para liberar el 35, 50 y 80 % de CO<sub>2</sub>, en este caso, se agrupa con el ácido málico, el ácido acético, el CO<sub>2</sub> y el glicerol, indicando que es un parámetro más sensible a la concentración de nitrógeno.

El efecto de una concentración deficiente de nitrógeno en los parámetros cinéticos y enológicos es menor que el observado en las condiciones NS:Normal y S:Normal. Sin embargo, dicha condición es la que más similitud presenta en condiciones industriales de vinificación. Independientemente de las condiciones analizadas, la agrupación de los mutantes *snf1Δ*, *gat1Δgln3Δ* y *ras2Δ* indica fenotipo similar. Esa agrupación de los mutantes de delección de proteínas implicadas en la represión catabólica por nitrógeno y las rutas de señalización SNF1 y Ras/cAMP/PKA, sugiere, de nuevo, la existencia de mecanismos de regulación compensatorios para todas las rutas que permite hacer frente a las condiciones adversas.



**Figura 128.** Análisis comparativo de los parámetros cinéticos y enológicos determinados en los mutantes de delección de proteínas clave en las rutas de señalización de nutrientes en crecimiento en mosto Sauvignon Blanc en condiciones de no agitación y mosto sin suplementar (NS:Low). Se representa el logaritmo en base 2 de los datos normalizados frente a la cepa de referencia C9 para cada uno de los parámetros analizados. El color rojo y el azul indican el grado en el que el parámetro observado está por encima o por debajo de la cepa control respectivamente. El agrupamiento tanto de los mutantes como de los parámetros se obtuvo mediante distancia euclídea.

## 4. Conclusión sobre el análisis de las rutas de señalización de nutrientes

La domesticación de las levaduras para la fermentación alcohólica del vino ha permitido obtener cepas tolerantes a las elevadas concentraciones de azúcares presentes en el mosto, al pH ácido, a altas concentraciones de etanol y, por lo general, al déficit de nitrógeno. De ahí la importancia del estudio de las rutas de señalización de nutrientes que permiten, mediante su comunicación cruzada, regular el metabolismo de las levaduras, su supervivencia y su proliferación. Debido a que el nitrógeno es un nutriente que, en muchas ocasiones, escasea al inicio de la fermentación del mosto, las investigaciones se han centrado principalmente en la ruta TOR, puesto que responde tanto a aminoácidos como a la fuente de nitrógeno.

Al inicio de este capítulo se ha estudiado la implicación de la proteína quinasa Sch9p en condiciones de vinificación, ya que se considera un regulador central de la fisiología celular, que coordina numerosos procesos en función de la fuente de nitrógeno a través de la ruta TOR. Tanto los análisis transcriptómicos como metabolómicos indican que Sch9p está implicada en la regulación del metabolismo (con un impacto en la biosíntesis de aminoácidos y en la producción de glicerol) y en la respuesta a estrés. También se analizó el metaboloma de la cepa que sobreexpresa el gen *GCN4*, implicado en el control general de aminoácidos (GAAC), ya que los aminoácidos constituyen un porcentaje muy elevado de la fuente de nitrógeno en el mosto. Los análisis metabolómicos mostraron que el factor transcripcional Gcn4p tiene un mayor impacto en el metabolismo celular en condiciones de vinificación que Sch9p ya que regula, no solo el metabolismo del nitrógeno, sino también el metabolismo central del carbono, aunque su mecanismo no coincide en todos sus aspectos con la función de Sch9p.

A continuación, se analizó la función de los activadores transcripcionales implicados en la represión catabólica por nitrógeno (NCR), Gat1p y Gln3p, debido a los resultados obtenidos en los estudios del estado de fosforilación de proteínas de las rutas de señalización de nutrientes. El análisis de la proteína Gln3p y de su fosforilación realizado en el capítulo 1 en condiciones de vinificación, sugiere que Gln3p está activa desde el inicio de la fermentación, es decir, la célula no se encuentra en condiciones de represión por nitrógeno; sin embargo, el contenido en nitrógeno asimilable empieza a considerarse parcialmente limitante a partir del segundo día de fermentación. El análisis fenómico de los mutantes *gat1Δ* y *gln3Δ* ha permitido ahondar más en su implicación en condiciones de vinificación. Los resultados procedentes del análisis fenómico sugieren que *GAT1* es necesario en la fase estacionaria, de ahí que el t50-lp y la V50-80 sean mayores, pero no en la fase de latencia. Además, el fenotipo de los mutantes de delección construidos en diversos fondos genéticos es el mismo. En concordancia con lo esperado en condiciones de laboratorio, *GAT1* sería necesario en condiciones de vinificación para hacer frente a las bajas concentraciones de nitrógeno, ya que induce la expresión de los genes de la permeasa general de aminoácidos *GAP1*, de la glutamina sintetasa *GLN1* y de la síntesis de proteínas implicadas en la degradación de arginina, asparagina y prolina (*CAR1*, *ASP3*, *PUT1/2*). Por lo tanto, los resultados obtenidos están en concordancia ya que, tal y como se observa de los parámetros cinéticos, *GAT1* es necesario para la fase estacionaria. Respecto a Gln3p, la elevada diversidad fenotípica observada en los mutantes *gln3Δ* en diversos fondos genéticos sugiere una regulación diferente para las cepas analizadas. Los análisis fenómicos indican que Gln3p es necesaria para la adaptación al mosto, estando en concordancia con los resultados de fosforilación del capítulo 1. También sugieren que Gln3p está implicada en el metabolismo de las fuentes de carbono, puesto que el mutante presenta una acumulación



tanto de piruvato como de ácido acético, y es incapaz de crecer en una fuente de carbono no fermentable en cepas vínicas. La activación observada de Gln3p desde el inicio de la fermentación puede proceder de su fosforilación de manera dependiente de Snf1p. Los análisis fenómicos en condiciones de vinificación sitúan a los mutantes en los factores tipo GATA más próximos del mutante en *SNF1*, apoyando esta idea.

Los fenotipos de interés enológico, como pueden ser una mayor concentración de glicerol o menor producción de ácido acético, suelen estar regulados por múltiples genes y varían entre diversos fondos genéticos. Sin embargo, ciertos fenotipos se deben a pequeñas variaciones de secuencia de un único gen. Por ejemplo, Trindade de Carvalho et al., (2017) identificaron un alelo dominante del gen *FAS2* que aumenta la producción de feniletilacetato, un metabolito aromático de gran interés en las bebidas alcohólicas fermentadas. El alelo que confería una mayor producción de feniletilacetato únicamente presentaba cinco mutaciones no sinónimas en la pauta de lectura. Por otra parte, Marullo et al., (2018) identificaron tres QTLs asociados a los genes *OYE1* y *VHS1*, responsables de la mayor tolerancia a elevadas temperaturas en fase estacionaria durante la fermentación. La secuenciación de genomas enteros de cepas vínicas indica que estas poseen versiones diferentes en los genes implicados en la respuesta a nutrientes *GAT1*, *RGS2* y *SDC25*. El estudio de la secuencia del gen *GAT1* determinó la existencia de 6 nucleótidos adicionales en cepas vínicas. Para discernir si el fenotipo de las cepas vínicas, como la mayor tolerancia a rapamicina, estaban relacionadas con la diferencia observada en la secuencia del gen *GAT1* se optó por realizar un reemplazamiento del alelo *GAT1* de cepas vínicas en cepas de laboratorio y viceversa. Las diferencias de secuencia observadas no explicaron el fenotipo de las cepas vínicas.

Se observó que la secuencia de los genes *RGS2* y *SDC25* difería entre determinadas cepas y se investigó si esas diferencias daban lugar a un fenotipo enológico determinado mediante fermentaciones alcohólicas de los mutantes de delección correspondientes, que no arrojaron un resultado positivo. Es posible que estas variaciones tengan efecto de forma coordinada o estén compensadas por alteraciones en otros lugares del genoma. Debido a la duplicación entera del genoma de la levadura, numerosos genes implicados en las rutas de señalización presentan parálogos capaces de suplir su función, al mismo tiempo que presentan funciones diferentes. Este caso se analizó con más detalle con las fosfodiesterasas Pde1/2p y con las proteínas Ras1/2p. Mientras que el mutante en el gen *PDE2* reduce los parámetros cinéticos de la fermentación, la proteína Ras2p parece ser esencial para una correcta fermentación alcohólica.

En condiciones de vinificación donde el nitrógeno escasea, los procesos metabólicos destinados a la movilización de fuentes de nitrógeno son de gran importancia. Aunque los grupos amino procedentes de la glutamina son los más frecuentemente movilizados, intermediarios del TCA también se utilizan como precursores para la síntesis de compuestos nitrogenados debido a la regulación realizada por la ruta retrógrada. *MKS1*, conocido como regulador negativo de la ruta retrógrada, también está implicado en numerosos procesos celulares, como la biosíntesis de lisina, la ruta Ras/cAMP/PKA y la regulación por nitrógeno a través de Gln3p. Su delección aumenta los niveles de glicerol y disminuye tanto la concentración de ácido acético y en ocasiones el etanol, fenotipo de interés enológico. Además, el fenotipo causado por su delección se mantiene en todos los fondos genéticos vínicos analizados, lo que indica un mecanismo regulador común.

Una conclusión general del estudio fenómico de un elevado número de mutantes en diversas rutas es que éstas afectan múltiples eventos celulares de manera distinta en respuesta a diferentes estímulos y no siempre de la manera esperada. No existe una dicotomía entre procesos relativos al metabolismo del nitrógeno y procesos relativos al metabolismo de la fuente de carbono. Factores tradicionalmente ligados al metabolismo del carbono pueden ver su función influida por la abundancia y escasez de nitrógeno, y así la fase de latencia del mutante *bcy1Δ* está afectada por este parámetro, y la producción de CO<sub>2</sub> máxima está influida por la delección de los genes *RAS1* o de *SNF1* de una manera dependiente de nitrógeno, lo cual no era un hecho evidente inicialmente. De manera contraria, existen funciones de los factores transcripcionales asociados al metabolismo del nitrógeno que dependen de la menor o mayor aireación, como la fase de latencia en el mutante *gcn4Δ* o la fructosa residual en el mutante *gln3Δ*.



## CONCLUSIONES

---



# Conclusiones

---

1. El análisis fenotípico realizado con diversas cepas de levadura, tanto de laboratorio como vnicas, demuestra la existencia de una gran variabilidad natural frente a inhibidores químicos del metabolismo, no existiendo una correlación positiva entre la tolerancia observada y los diferentes requerimientos de nitrógeno. La mayor tolerancia de las cepas vnicas a rapamicina y a inductores de la represión por glucosa sugiere un cierto grado de variabilidad genética en lo que respecta a las rutas de señalización de nutrientes en levaduras vnicas.
2. El glufosinato de amonio, inhibidor de la glutamina sintetasa, inhibe el crecimiento y extiende la longevidad cronológica en condiciones de vinificación como consecuencia del ayuno de nitrógeno causado. El control general de aminoácidos vía Gcn2p es la ruta principal de señalización de nutrientes implicada en la tolerancia frente a dicho inhibidor, aunque el análisis metabolómico realizado sugiere la implicación de otras rutas de señalización de nutrientes, como TORC1.
3. Los dos experimentos de evolución dirigida realizados han permitido obtener cepas más tolerantes a rapamicina (cepa M2) y a 2-desoxiglucosa (cepa EC1118), si bien no se han obtenido fenotipos mejorados para su aplicación industrial.
4. En condiciones de laboratorio, la fosforilación diferencial de la proteína Rps6p en presencia de rapamicina en cepas vnicas y en cepas de laboratorio sugiere una señalización de la ruta TORC1 diferente de ciertos aspectos, aunque otros estímulos estudiados y el resto de las dianas analizadas sugieren que el grueso de la señalización se conserva. En condiciones de vinificación, las rutas TORC1 solo está activa en las primeras horas y SNF1 presenta su máxima actividad alrededor de 1 día, mientras que la ruta Ras/cAMP/PKA se mantiene activa a lo largo de todo el proceso, sugiriendo que esta es la ruta reguladora principal en esas condiciones.
5. La proteína quinasa Sch9p y el factor transcripcional Gcn4p influyen profundamente en la fisiología celular, en el metabolismo y en la longevidad cronológica. Ambos alteran el metabolismo central del carbono y la producción de glicerol en condiciones de vinificación de manera similar, y sin embargo el impacto sobre el resto del metabolismo es diferente.
6. El análisis fenómico de los mutantes de delección sugiere la implicación del activador transcripcional Gln3p en condiciones de vinificación pero no de Gat1p. La diferencia de secuencia observada en el gen *GAT1* no explica el fenotipo diferencial entre cepas vnicas y cepas de laboratorio frente a la rapamicina. La proteína de unión a GTP Ras2p, y no su parólogo Ras1p, como proteína señalizadora de glucosa y activadora de PKA, es de gran importancia tanto en la adaptación a las condiciones de vinificación como en la producción de metabolitos enológicos.
7. *MKS1*, regulador negativo de la ruta retrógrada, es una buena diana para la obtención de cepas mejoradas de aplicabilidad industrial en condiciones de fermentación alcohólica debido a su papel intermediario en la regulación del nitrógeno, en la ruta PKA y la ruta

retrógrada. Su delección causa un aumento de glicerol y una reducción de ácido acético, características de gran importancia en el vino.

8. El análisis fenómico global de todas las cepas y mutantes de delección en proteínas diana que forman parte de las principales rutas de señalización de nutrientes muestra que no existe división entre la señalización de fuente de carbono y la de nitrógeno, sino una comunicación cruzada adecuadamente regulada entre todas las rutas de señalización de nutrientes que permite que el metabolismo celular se adecúe a las condiciones ambientales.

## BIBLIOGRAFÍA

---





# Bibliografía

---

- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., y Stearns, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Ed.). CSHL Press.
- Albertini, M., Girzalsky, W., Veenhuis, M., y Kunau, W. H. (2001). Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *Eur. J. Cell Biol.*, 80(4), 257-270. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00164>
- Albrecht, M., y Kortekamp, A. (2009). The in vitro effect of the herbicide basta(R) (glufosinate ammonium) on potential fungal grapevine pathogens. *Eur. J. Hort. Sci.*, 74(3), 112-117.
- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., y Querol, A. (2017). Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Front. Microbiol.*, 8, 150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00150>
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M., y Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 16(9), 2179-2187. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2179>
- Aranda, A., Matallana, E., y Olmo, M. (2011). *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. En *Molecular Wine Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10001-3>
- Arias, P., Díez-Muñiz, S., García, R., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J. M., y Arroyo, J. (2011). Genome-wide survey of yeast mutations leading to activation of the yeast cell integrity MAPK pathway: Novel insights into diverse MAPK outcomes. *BMC Genomics*, 12(1), 390. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-390>
- Backhus, L. E., DeRisi, J., Brown, P. O., y Bisson, L. F. (2001). Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. *FEMS Yeast Res.*, 1(2), 111-125. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2001.tb00022.x>
- Bakalinsky, A. T., y Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6(5), 367-382. <https://doi.org/10.1002/yea.320060503>
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., y Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), 115-132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
- Barrett, L., Orlova, M., Maziarz, M., y Kuchin, S. (2012). Protein Kinase A Contributes to the Negative Control of Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 11(2), 119-128. <https://doi.org/10.1128/ec.05061-11>
- Bauer, F. F., y Pretorius, I. S. (2019). Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review. *South African J. Enol. Vitic.*, 21(1). <https://doi.org/10.21548/21-1-3557>

- Beck, T., y Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762), 689-692. <https://doi.org/10.1038/45287>
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., y Moreno-Arribas, V. (2017). Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, 22(189), 1-29. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., y Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 53(4), 996-1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., y Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 4(6), 625-632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., y Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 70(4), 246-252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Berriz, G. F., Beaver, J. E., Cenik, C., Tasan, M., y Roth, F. P. (2009). Next generation software for functional trend analysis. *Bioinforma. Appl. NOTE*, 25(22), 3043-3044. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp498>
- Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Chan, T. F., Ai, W., y Zheng, X. F. S. (2002). Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Mol. Cell. Biol.*, 22(4), 1246-1252. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1246-1252.2002>
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., y Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/BF00351734>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(1), 107-119.
- Bitterman, K. J., Medvedik, O., y Sinclair, D. A. (2003). Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking Metabolism, Genome Stability, and Heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(3), 376-399. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.3.376-399.2003>
- Blateyron, L., y Sablayrolles, J.-M. (2001). Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *J. Biosci. Bioeng.*, 91(2), 184-189. <https://doi.org/10.1263/jbb.91.184>
- Blinder, D., Coschigano, P. W., y Magasanik, B. (1996). Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 178(15), 4734-4736. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4734-4736.1996>
- Boeckstaens, M., Merhi, A., Llinares, E., Van Vooren, P., Springael, J. Y., Wintjens, R., y Marini, A. M. (2015). Identification of a Novel Regulatory Mechanism of Nutrient Transport Controlled by TORC1-Npr1-Amu1/Par32. *PLoS Genet.*, 11(7), 1-28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005382>
- Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., y Shadel, G. S. (2007). Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metab.*, 5(4), 265-277. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.009>

- Borneman, A. R., Forgan, A. H., Kolouchova, R., Fraser, J. A., y Schmidt, S. A. (2016). Whole Genome Comparison Reveals High Levels of Inbreeding and Strain Redundancy Across the Spectrum of Commercial Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3-Genes Genomes Genet.*, 6(4), 957-971. <https://doi.org/10.1534/g3.115.025692>
- Borneman, A. R., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., y Chambers, P. J. (2008). *Comparative genome analysis of a Saccharomyces cerevisiae wine strain*. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00434.x>
- Borneman, A. R., y Pretorius, I. S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics*, 199(2), 281-291. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173633>
- Borneman, A. R., Schmidt, S. A., y Pretorius, I. S. (2013). At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends Genet.*, 29(4), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.014>
- Boy-Marcotte, E., Ikononi, P., y Jacquet, M. (1996). SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Mol. Biol. Cell*, 7(4), 529-539. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.4.529>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brown, J. C. S., y Lindquist, S. (2009). A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes Dev.*, 23(19), 2320-2332. <https://doi.org/10.1101/gad.1839109>
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Deminoff, S. J., y Herman, P. K. (2005). An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(39), 13933-13938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501046102>
- Burtner, C. R., Murakami, C. J., Kennedy, B. K., y Kaerberlein, M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle*, 8(8), 1256-1270. <https://doi.org/10.4161/cc.8.8.8287>
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., y Vanoni, M. (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors*, 10(6), 6195-6240. <https://doi.org/10.3390/s100606195>
- Byrne, L. J., Cole, D. J., Cox, B. S., Ridout, M. S., Morgan, B. J. T., y Tuite, M. F. (2009). The Number and Transmission of [PSI + ] Prion Seeds (Propagons) in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004670>
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Farris, G. A., Sotgiu, C., y Minelli, E. V. (1997). Persistence and Metabolism of Folpet in Grapes and Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 45(2), 476-479. <https://doi.org/10.1021/jf960353a>
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M., Cabitza, F., Pala, M., y Farris, G. A. (2000). Fate of quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products. *J. Agric. Food Chem.*, 48(12), 6128-6131. <https://doi.org/10.1021/jf0007176>
- Cambon, B., Monteil, V., Remize, F., Camarasa, C., y Dequin, S. (2006). Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4688-4694. <https://doi.org/10.1128/AEM.02975-05>

- Cannon, J. F., y Tatchell, K. (1987). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 7(8), 2653-2663. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.8.2653>
- Cardona, F., Carrasco, P., Enrique Pérez-Ortín, J., Lí Del Olmo, M., y Aranda, A. (2007). A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.043>
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., y González, R. (2011). *Molecular Wine Microbiology*.
- Caspeta, L., Chen, Y., y Nielsen, J. (2016). Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Sci. Rep.*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27003>
- Česnik, B. H., Gregorčič, A., y Čuš, F. (2008). Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, 25(4), 438-443. <https://doi.org/10.1080/02652030701558490>
- Chelstowska, A., y Butow, R. A. (1995). RTG Genes in Yeast That Function in Communication between Mitochondria and the Nucleus Are Also Required for Expression of Genes Encoding Peroxisomal Proteins. *J. Biol. Chem.*, 270(30), 18141-18146. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.18141>
- Chen, J. C. Y., y Powers, T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 49(5), 281-293. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0055-9>
- Cherkasova, V., y Hinnebusch, A. G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *Genes Dev.*, 17(7), 859-872. <https://doi.org/10.1101/gad.1069003>
- Cherkasova, V., Qiu, H., y Hinnebusch, A. G. (2010). Snf1 Promotes Phosphorylation of the Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 by Activating Gcn2 and Inhibiting Phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol. Cell. Biol.*, 30(12), 2862-2873. <https://doi.org/10.1128/mcb.00183-10>
- Codón, A. C., Gasent-Ramírez, J. M., y Benítez, T. (1995). Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 630-638.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., y Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En *FEMS microbiology reviews* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Cooper, T. G. (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: Connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(3), 223-238. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00071-2)
- Cox, K. H., Kulkarni, A., Tate, J. J., y Cooper, T. G. (2004). Gln3 Phosphorylation and Intracellular Localization in Nutrient Limitation and Starvation Differ from Those Generated by Rapamycin Inhibition of Tor1/2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279(11), 10270-10278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312023200>

- Cox, K. H., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J. R., Jonathan, A., y Cooper, T. G. (2000). Saccharomyces cerevisiae GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J Biol Chem*, 275(23), 17611-17618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001648200>. Saccharomyces
- Cox, K. H., Tate, J. J., y Cooper, T. G. (2002). Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M204879200>
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., y Camarasa, C. (2014). Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by Saccharomyces cerevisiae wine strains during wine fermentation. *Microb Cell Fact*, 13, 13. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13>
- Crépin, L., Truong, N. M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., y Camarasa, C. (2017). Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by Saccharomyces cerevisiae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(5). <https://doi.org/10.1128/aem.02617-16>
- Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B., y Hall, M. N. (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(10), 6784-6789. <https://doi.org/10.1073/pnas.102687599>
- Cunningham, T. S., Andhare, R., y Cooper, T. G. (2000). Nitrogen catabolite repression of DAL80 expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.*, 275(19), 14408-14414. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14408>
- Curran, B. P. G., y Carter, B. L. A. (1986). x-factor enhancement of hybrid formation by protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae II. *Curr. Genet.*, 10(12), 943-945. <https://doi.org/10.1007/BF00398292>
- Da Silva, T., Albertin, W., Dillmann, C., Bely, M., La Guerche, S., Giraud, C., Huet, S., Sicard, D., Masneuf-Pomarede, I., De Vienne, D., y Marullo, P. (2015). Hybridization within Saccharomyces genus results in homeostasis and phenotypic novelty in winemaking conditions. *PLoS One*, 10(5), 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123834>
- Damak, F., Boy-Marcotte, E., Le-Roscouet, D., Guilbaud, R., y Jacquet, M. (1991). SDC25, a CDC25-like gene which contains a RAS-activating domain and is a dispensable gene of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.*, 11(1), 202-212. <https://doi.org/10.1128/MCB.11.1.202>
- Daugherty, J. O. N. R., Rai, R., Berry, H. M. E. L., y Cooper, T. G. (1993). *Catabolite Repression in Saccharomyces*. 175(1), 64-73.
- Deed, N. K., van Vuuren, H. J. J., y Gardner, R. C. (2011). Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of S. cerevisiae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89(5), 1537-1549. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3084-y>
- del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M. G., y Jiménez, A. (1991). Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr. Genet.*, 19(5), 353-358.

- Delneri, D., Tomlin, G. C., Wixon, J. L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E. J., y Oliver, S. G. (2000). Exploring redundancy in the yeast genome: An improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, 252(1-2), 127-135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00217-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00217-1)
- Dequin, S., Escudier, J.-L., Bely, M., Noble, J., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Marullo, P., Salmon, J.-M., y Sablayrolles, J.-M. (2017). How to adapt winemaking practices to modified grape composition under climate change conditions. *OENO One*, 51(2), 205. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.0.0.1584>
- Dihazi, H., Kessler, R., y Eschrich, K. (2003). Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochemistry*, 42(20), 6275-6282. <https://doi.org/10.1021/bi034167r>
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J. C. Y., y Powers, T. (2004). Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1p-Rtg3p-dependent target genes. *J. Biol. Chem.*, 279(45), 46527-46535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409012200>
- Dilova, I., Chen, C. Y., y Powers, T. (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.*, 12(5), 389-395. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00677-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00677-2)
- Dilova, I., y Powers, T. (2006). Accounting for strain-specific differences during RTG target gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 6(1), 112-119. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00008.x>
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., y du Toit, M. (2006). Oxygen in Must and Wine: A review. *South African J. Enol. Vitic.*, 27(1), 76-94. <https://doi.org/10.21548/27-1-1610>
- Dudley, A. M., Janse, D. M., Tanay, A., Shamir, R., y Church, G. M. (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.*, 1(1), E1-E11. <https://doi.org/10.1038/msb4100004>
- Dujon, B. A., y Louis, E. J. (2017). Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (*Saccharomycotina*). En *Yeastbook* (pp. 717-750). <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216>
- Dukes, B. C., y Butzke, C. E. (1998). *Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay*. Recuperado de <http://www.ajevonline.org/content/ajev/49/2/125.full.pdf>
- Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., y Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 031(41), 95-128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>
- Eaglestone, S. S., Ruddock, L. W., Cox, B. S., y Tuite, M. F. (2002). Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI<sup>+</sup>] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(1), 240-244. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.240>
- Eder, M., Sanchez, I., Brice, C., Camarasa, C., Legras, J.-L., y Dequin, S. (2018). QTL mapping of volatile compound production in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *BMC Genomics*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4562-8>
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., ... Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.*, 11(11), 1305-1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>

- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., y Karin, M. (1994). The UV response involving the ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell*, 77(3), 381-390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90153-8)
- Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale, W., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R., y Butow, R. A. (2001). Genome-wide Responses to Mitochondrial Dysfunction. *Mol. Biol. Cell*, 12(2), 297-308. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.297>
- Fabrizio, P. (2001). Regulation of Longevity and Stress Resistance by Sch9 in Yeast. *Science* (80-.), 292(5515), 288-290. <https://doi.org/10.1126/science.1059497>
- Fabrizio, P., y Longo, V. D. (2007). The Chronological Life Span of *Saccharomyces cerevisiae*. En *Biological Aging* (pp. 89-95). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_8)
- Fabrizio, P., y Longo, V. D. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biogerontology*, 1783(7), 1280-1285. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.017.Chronological>
- Fayyadkazan, M., Tate, J. J., Vierendeels, F., Cooper, T. G., Dubois, E., y Georis, I. (2014). Components of Golgi-to-vacuole trafficking are required for nitrogen- and TORC1-responsive regulation of the yeast GATA factors. *Microbiologyopen*, 3(3), 271-287. <https://doi.org/10.1002/mbo3.168>
- Fernández-García, P., Peláez, R., Herrero, P., y Moreno, F. (2012). *Phosphorylation of Yeast Hexokinase 2 Regulates Its Nucleocytoplasmic Shuttling* \*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401679>
- Ferreira, P. C., Ness, F., Edwards, S. R., Cox, B. S., y Tuite, M. F. (2001). The elimination of the yeast [PSI<sup>+</sup>] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol. Microbiol.*, 40(6), 1357-1369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02478.x>
- Fleet, G. H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. En *Microbiology of Fermented Foods* (pp. 217-262). [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_9)
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. En *FEMS Yeast Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Flores, C. L., y Gancedo, C. (2018). Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain able to grow on glucosamine as sole carbon and nitrogen source. *Sci. Rep.*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35045-8>
- Fugelsang, K. C. (1997). *Wine Microbiology*. Springer.
- Gamero-Sandemetrio, E., Payá-Tormo, L., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., y Matallana, E. (2018). Non-canonical regulation of glutathione and trehalose biosynthesis characterizes non-*Saccharomyces* wine yeasts with poor performance in active dry yeast production. *Microb. Cell*, 5(4), 184-197. <https://doi.org/10.15698/mic2018.04.624>
- Gamero-Sandemetrio, E., Torrellas, M., Rábena, M. T., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., y Matallana, E. (2015). Food-grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative performance and antioxidant defenses of active dry wine yeast. *AMB Express*, 5(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0159-7>
- García, R., Bravo, E., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J. M., y Arroyo, J. (2017). A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Sci. Rep.*, 7, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06001-9>



- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., y Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 136(3), 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018>
- Gawel, R., Francis, L., y Waters, E. J. (2007a). Statistical Correlations between the In-Mouth Textural Characteristics and the Chemical Composition of Shiraz Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55(7), 2683-2687. <https://doi.org/10.1021/jf0633950>
- Gawel, R., van Sluyter, S., y Waters, E. J. (2007b). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 13(1), 38-45. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00070.x>
- Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F., y Dubois, E. (2009). The Yeast GATA Factor Gat1 Occupies a Central Position in Nitrogen Catabolite Repression-Sensitive Gene Activation. *Mol. Cell. Biol.*, 29(13), 3803-3815. <https://doi.org/10.1128/MCB.00399-09>
- Georis, I., Tate, J. J., Vierendeels, F., Cooper, T. G., y Dubois, E. (2015). Premature termination of GAT1 transcription explains paradoxical negative correlation between nitrogen-responsive mRNA, but constitutive low-level protein production. *RNA Biol.*, 12(8), 824-837. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1058476>
- Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J., y Butow, R. A. (2005). Retrograde response to mitochondrial dysfunction is separable from TOR1/2 regulation of retrograde gene expression. *J. Biol. Chem.*, 280(52), 42528-42535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509187200>
- Gietz, R. D., y Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.*, 350, 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., y Andre, B. (2007). Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 27(8), 3065-3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., y Matallana, E. (2010a). Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-9>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., y Matallana, E. (2010b). Improving yield of industrial biomass propagation by increasing the Trx2p dosage. *Bioeng. Bugs.* <https://doi.org/10.4161/bbug.1.5.12384>
- Gonzalez, S., y Rallis, C. (2017). The TOR Signaling Pathway in Spatial and Temporal Control of Cell Size and Growth. *Front. Cell Dev. Biol.*, 5, 61. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00061>
- González, A., Shimobayashi, M., Eisenberg, T., Merle, D. A., Pendl, T., Hall, M. N., y Moustafa, T. (2015). TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC Kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 10(3), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120250>

- Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., y Pretorius, I. S. (2016). *Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12488>
- Graef, M., y Nunnari, J. (2011). Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO J.*, 30(11), 2101-2114. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.104>
- Grenson, M. (1966). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 127(2), 339-346. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(66\)90388-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(66)90388-6)
- Gressner, A. M., y Wool, I. G. (1974). The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. *J. Biol. Chem.*, 249(21), 6917-6925.
- Guldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., y Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 24(13), 2519-2524. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Hadfield, C., Jordan, B. E., Mount, R. C., Pretorius, G. H. J., y Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 18(4), 303-313. <https://doi.org/10.1007/BF00318211>
- Halfmann, R., Jarosz, D. F., Jones, S. K., Chang, A., Lancaster, A. K., y Lindquist, S. (2012). Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature*, 482(7385), 363-368. <https://doi.org/10.1038/nature10875>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., y Barlow, M. (2013). Growth Rates Made Easy. *Mol. Biol. Evol.*, 31(1), 232-238. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246(2), 501-514. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90305-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-X)
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Henschke, P. A., y Jiranek, V. (1993). Yeast: Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. En *Wine Microbiology and Biotechnology*. (pp. 77-164). <https://doi.org/10.1089/end.2014.0018>
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(6), 602-607. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00377-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00377-6)
- Hinnebusch, A. G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 407-450. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833>
- Homann, O. R., Dea, J., Noble, S. M., y Johnson, A. D. (2009). A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet.*, 5(12), 1000783. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000783>
- Hong, S. P., y Carlson, M. (2007). Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J. Biol. Chem.*, 282(23), 16838-16845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700146200>

- Hu, J., Wei, M., Mirzaei, H., Madia, F., Mirisola, M., Amparo, C., Chagoury, S., Kennedy, B., y Longo, V. D. (2014). Tor-Sch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell*, 13(3), 457-467. <https://doi.org/10.1111/accel.12202>
- Huang, X., Liu, J., y Dickson, R. C. (2012). Down-Regulating Sphingolipid Synthesis Increases Yeast Lifespan. *PLoS Genet*, 8(2), 1002493. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002493>
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., y Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin- sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev.*, 1929-1943. <https://doi.org/10.1101/gad.532109>
- Hughes Hallett, J. E., Luo, X., y Capaldi, A. P. (2014). State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(2), 773-786. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168369>
- Inoue, T., Wang, Y., Jefferies, K., Qi, J., Hinton, A., y Forgac, M. (2005). Structure and Regulation of the V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 37(6). <https://doi.org/10.1007/s10863-005-9478-8>
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., y Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153(1), 163-168.
- J. Jaspers, C., Gigot, D., y J. Penninckx, M. (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 24(4), 703-707. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84880-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84880-3)
- Jackson, R. S. (2000). Wine Science: Principles and Applications. En *Wine Science*. <https://doi.org/10.1016/b978-012379062-0/50010-x>
- Jia, M. H., Larossa, R. A., Lee, J. M., Rafalski, A., Derosé, E., Gonye, G., y Xue, Z. (2000). Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol. Genomics*, 3(2), 83-92. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.3.2.83>
- Jiang, Y., y Broach, J. R. (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.*, 18(10), 2782-2792. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2782>
- Jiménez-Martí, E., Zuzuarregui, A., Gomar-Alba, M., Gutiérrez, D., Gil, C., y Del Olmo, M. (2011). Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 145(1), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.023>
- Johnston, J. R., Baccari, C., y Mortimer, R. K. (2000). Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res. Microbiol.*, 151(7), 583-590. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00228-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00228-X)
- Jolly, N. P., Varela, C., y Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.*, 14(2), 215-237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., y Storchmann, K. (2005). Climate Change and Global Wine Quality. *Springer*, 73, 319-343. <https://doi.org/10.1007/s10584-005-4704-2>

- Jung, S., Marelli, M., Rachubinski, R. A., Goodlett, D. R., y Aitchison, J. D. (2010). Dynamic changes in the subcellular distribution of gpd1p in response to cell stress. *J. Biol. Chem.*, 285(9), 6739-6749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058552>
- Kaeberlein, M. (2006). Longevity and Aging in Budding Yeast. *Handb. Model. Hum. Aging*, 207-217. <https://doi.org/10.1016/B978-012369391-4/50019-9>
- Kaeberlein, M. (2010). *Lessons on longevity from budding yeast*. 464(7288), 513-519. <https://doi.org/10.1038/nature08981.Lessons>
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S., y Kennedy, B. K. (2005). Regulation of Yeast Replicative Life Span by TOR and Sch9 in Response to Nutrients. *Science (80-. )*, 310(5751), 1193-1196. <https://doi.org/10.1126/science.1115535>
- Karpel, J. E., y Bisson, L. F. (2006). Aquaporins in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiol. Lett.*, 257(1), 117-123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00161.x>
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., y Lander, E. S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, 423(6937), 241-254. <https://doi.org/10.1038/nature01644>
- Kim, J. H., y Johnston, M. (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 281(36), 26144-26149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603636200>
- Kim, S., Ohkuni, K., Couplan, E., y Jazwinski, S. M. (2004). The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology*, 5(5), 305-316. <https://doi.org/10.1007/s10522-004-2568-x>
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., y Anraku, Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 170(6), 2683-2686. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2683-2686.1988>
- Klinger, H., Rinnerthaler, M., Lam, Y. T., Laun, P., Heeren, G., Klocker, A., Simon-Nobbe, B., Dickinson, J. R., Dawes, I. W., y Breitenbach, M. (2010). Quantitation of (a)symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells. *Exp. Gerontol.*, 45(7-8), 533-542. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.016>
- Koltin, Y., Faucette, L., Bergsma, D. J., Levy, M. A., Cafferkey, R., Koser, P. L., Johnson, R. K., y Livi, G. P. (2015). Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 11(3), 1718-1723. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.3.1718>
- Komeili, A., Wedaman, K. P., O'shea, E. K., y Powers, T. (2000). Mechanism of metabolic control: Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.*, 151(4), 863-878. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.4.863>
- Koppram, R., Albers, E., y Olsson, L. (2012). Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnol. Biofuels*, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-32>

- Koser, P. L., Eng, W. K., Bossard, M. J., McLaughlin, M. M., Cafferkey, R., Sathe, G. M., Faucette, L., Levy, M. A., Johnson, R. K., Bergsma, D. J., y Livi, G. P. (1993). The tyrosine89 residue of yeast FKBP12 is required for rapamycin binding. *Gene*, 129(2), 159-165. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90264-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90264-4)
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V, Van Dijck, P., Winderickx, J., De Winde, J. H., y Thevelein, J. M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.*, 32(5), 1002-1012. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01413.x>
- Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T., y Ito, T. (2003). Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *J. Biol. Chem.*, 278(23), 20457-20460. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300133200>
- Kulkarni, A., Buford, T. D., Rai, R., y Cooper, T. G. (2006). Differing responses of Gat1 and Gln3 phosphorylation and localization to rapamycin and methionine sulfoximine treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 6(2), 218-229. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00031.x>
- Kunz, J., Loeschmann, A., Deuter-Reinhard, M., y Hall, M. N. (2000). FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin for binding to FKBP12 in yeast. *Mol. Microbiol.*, 37(6), 1480-1493. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02105.x>
- Kuo, M. H., Vom Baur, E., Struhl, K., y Allis, C. D. (2000). Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol. Cell*, 6(6), 1309-1320. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00129-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00129-5)
- Kutyna, D. R., Varela, C., Stanley, G. A., Borneman, A. R., Henschke, P. A., y Chambers, P. J. (2012). Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(3), 1175-1184. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3622-7>
- Lafontaine, I., Fischer, G., Talla, E., y Dujon, B. A. (2004). Gene relics in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 335(1-2), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.03.028>
- Lakhani, R., Vogel, K. R., Till, A., Liu, J., Burnett, S. F., Gibson, K. M., y Subramani, S. (2014). Defects in GABA metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by mTOR inhibition. *EMBO Mol. Med.*, 6(4), 551-566. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303356>
- Lakshmanan, J., Mosley, A. L., y Özcan, S. (2003). Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Curr. Genet.*, 44(1), 19-25. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0423-2>
- Lambrechts, M. G., y Pretorius, I. S. (2019). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J. Enol. Vitic.*, 21(1), 97-123. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- Lane, S., Xu, H., Oh, E. J., Kim, H., Lesmana, A., Jeong, D., Zhang, G., Tsai, C.-S., Jin, Y.-S., y Kim, S. R. (2018). Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 8(1), 2613. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20804-4>

- Larsson, C., Pahlman, I. L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., y Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(4), 347-357. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980315\)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9)
- Laxman, S., y Tu, B. P. (2011). Multiple TORC1-associated proteins regulate nitrogen starvation-dependent cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026081>
- Leao, C., y Van Uden, N. (1983). Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, XXVI, 403-405. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15542.x>
- Lee, P., Cho, B. R., Joo, H. S., y Hahn, J. S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol. Microbiol.*, 70(4), 882-895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06450.x>
- Legras, J.-L., y Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221(2), 249-255. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00205-2)
- Li, H., Tsang, C. K., Watkins, M., Bertram, P. G., y Zheng, X. F. S. (2006). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature*, 442(7106), 1058-1061. <https://doi.org/10.1038/nature05020>
- Li, J., Vázquez-García, I., Persson, K., González, A., Yue, J. X., Barré, B., Hall, M. N., Long, A., Warringer, J., Mustonen, V., y Liti, G. (2019). Shared Molecular Targets Confer Resistance over Short and Long Evolutionary Timescales. *Mol. Biol. Evol.*, 36(4), 691-708. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz006>
- Lin, Y. R., Kim, K., Yang, Y., Ivessa, A., Sadoshima, J., y Park, Y. (2011). Regulation of longevity by regulator of G-protein signaling protein, Loco. *Aging Cell*, 10(3), 438-447. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00678.x>
- Liu, Z., y Butow, R. A. (2006). Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annu. Rev. Genet.*, 40(1), 159-185. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090613>
- Liu, Y., Xu, X., y Kuo, M. H. (2010). Snf1p regulates Gcn5p transcriptional activity by antagonizing Spt3p. *Genetics*, 184(1), 91-105. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.110957>
- Ljungdahl, P. O., y Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Genetics* (Vol. 190, pp. 885-929). <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Loewith, R., y Hall, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. En *Genetics* (Vol. 189, pp. 1177-1201). <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133363>
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., y Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell*, 10(3), 457-468. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408816>
- Longo, V. D., y Fabrizio, P. (2012). Chronological aging in *saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem*, Vol. 57, pp. 101-121. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002>

- Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaerberlein, M., y Kennedy, B. K. (2012). Replicative and chronological aging in *saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.*, 16(1), 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002>
- Longo, E., y Vezinhet, F. (1993). Chromosomal Rearrangements during Vegetative Growth of a Wild Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1), 322-326.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., y Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U)
- Lorenz, M. C., y Heitman, J. (1995). TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J. Biol. Chem.*, 270(46), 27531-27537. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27531>
- Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E., y Lagunas, R. (2000). Internal Trehalose Protects Endocytosis from Inhibition by Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4456-4461. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4456-4461.2000>
- Ma, M., y Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 87, pp. 829-845. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2594-3>
- Magazinnik, T., Anand, M., Sattlegger, E., Hinnebusch, A. G., y Kinzy, T. G. (2005). Interplay between GCN2 and GCN4 expression, translation elongation factor 1 mutations and translational fidelity in yeast. *Nucleic Acids Res.*, 33(14), 4584-4592. <https://doi.org/10.1093/nar/gki765>
- Marion, R. M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., y O'Shea, E. K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(40), 14315-14322. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405353101>
- Marks, V. D., Ho Sui, S. J., Erasmus, D., van der Merwe, George, K., Brumm, J., Wasserman, W. W., Bryan, J., y van Vuuren, H. J. J. (2008). Dynamics of the Yeast Transcriptome during Wine Fermentation Reveals a Novel Fermentation Stress Response. *FEMS Yeast Res.*, 22(1), 222-223. <https://doi.org/10.1111/j>
- Marsit, S., y Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Res.*, 15(7), 1-12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067>
- Martín, H., Castellanos, M. C., Cenamor, R., Sánchez, M., Molina, M., y Nombela, C. (1996). Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr. Genet.*, 29(6), 516-522. <https://doi.org/10.1007/BF02426955>
- Marullo, P., Durrens, P., Bernard, M., Mansour, C., y Dubordieu, D. (2018). QTL mapping of natural allelic variations of *Saccharomyces cerevisiae* impacting stuck fermentations caused by high temperature in wine. *BMC Genomics*.
- Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L. C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M. P., y Grant, C. M. (2008). Gcn4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2995-3007. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-11-1173>
- Matsui, T., Linder, R., Phan, J., Seidl, F., y Ehrenreich, I. M. (2015). Regulatory rewiring in a cross causes extensive genetic heterogeneity. *Genetics*, 201(2), 769-777. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.180661>

- McBryde, C., Gardner, J. M., De Barros Lopes, M., y Jiranek, V. (2006). Generation of novel yeast strains by adaptive evolution. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57(4), 423-430.
- McCartney, R. R., Chandrashekarappa, D. G., Zhang, B. B., y Schmidt, M. C. (2014). Genetic analysis of resistance and sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(2), 635-646. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169060>
- McCartney, R. R., y Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.*, 276(39), 36460-36466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104418200>
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., y Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), 480-481. <https://doi.org/10.1038/381480a0>
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nunez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C. -s., Cheng, G., Zhao, Z., y Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(51), 17593-17598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102>
- Mehdi, K., y Penninckx, M. J. (1997). An important role for glutathione and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143(6), 1885-1889. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-1885>
- Meyuhas, O. (2008). Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. En *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 268, pp. 1-37). [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00801-0](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00801-0)
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., y Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany. NY.)*, 3(8), 716-732. <https://doi.org/10.18632/aging.100361>
- Miosga, T., y Zimmermann, F. K. (1996). Sequence analysis of the CEN12 region of *Saccharomyces cerevisiae* on a 43.7 kb fragment of chromosome XII including an open reading frame homologous to the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein CFTR. *Yeast*, 12(7), 693-708. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960615\)12:7<693::AID-YEA956>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960615)12:7<693::AID-YEA956>3.0.CO;2-G)
- Mösch, H.-U., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G. R., y Braus, G. H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled Mitogen-activated Protein Kinase and cAMP Pathways during Invasive Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 10(5), 1325-1335. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1325>
- Mozell, M. R., y Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions. *Wine Econ. Policy*, 3(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., y Marton, M. J. (2002). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 21(13), 4347-4368. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.13.4347-4368.2001>
- Neklesa, T. K., y Davis, R. W. (2008). Superoxide anions regulate TORC1 and its ability to bind Fpr1:rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(39), 15166-15171. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807712105>



- Nevoigt, E., y Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21(3), 231-241. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00058-2)
- Nicastro, R., Tripodi, F., Gaggini, M., Castoldi, A., Reghellin, V., Nonnis, S., Tedeschi, G., y Coccetti, P. (2015). Snf1 phosphorylates adenylate cyclase and negatively regulates protein kinase A-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 290(41), 24715-24726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658005>
- Nikawa, J.-I., Sass, P., y Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 7(10), 3629-3636. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.10.3629>
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., y Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(38), 16333-16338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904673106>
- O'Donnell, A. F., McCartney, R. R., Chandrashekarappa, D. G., Zhang, B. B., Thorner, J., y Schmidt, M. C. (2015). 2-Deoxyglucose Impairs *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Stimulating Snf1-Regulated and  $\alpha$ -Arrestin-Mediated Trafficking of Hexose Transporters 1 and 3. *Mol. Cell. Biol.*, 35(6), 939-955. <https://doi.org/10.1128/mcb.01183-14>
- Olivares-Marin, I. K., Madrigal-Perez, L. A., Canizal-Garcia, M., García-Almendárez, B. E., González-Hernández, J. C., y Regalado-Gonzalez, C. (2018). Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(10), 4535-4548. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8951-3>
- Onodera, J., y Ohsumi, Y. (2004). Ald6p Is a Preferred Target for Autophagy in Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279(16), 16071-16076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312706200>
- Onodera, J., y Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.*, 280(36), 31582-31586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506736200>
- Orlova, M., Barrett, L., y Kuchin, S. (2008). Detection of endogenous Snf1 and its activation state: application to *Saccharomyces* and *Candida* species. *Yeast*, 25(10), 745-754. <https://doi.org/10.1002/yea.1628>
- Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., y Kuchin, S. (2006). Nitrogen Availability and TOR Regulate the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 5(11), 1831-1837. <https://doi.org/10.1128/EC.00110-06>
- Orlova, M., Ozcetin, H., Barrett, L., y Kuchin, S. (2010). Roles of the Snf1-Activating Kinases during Nitrogen Limitation and Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 9(1), 208-214. <https://doi.org/10.1128/ec.00216-09>
- Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2012a). Oxidative stress tolerance, adenylate cyclase, and autophagy are key players in the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8), 2748-2757. <https://doi.org/10.1128/AEM.07261-11>

- Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2012b). Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions. *Microb. Cell Fact.*, 11(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-104>
- Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2012c). Wine yeast sirtuins and Gcn5p control aging and metabolism in a natural growth medium. *Mech. Ageing Dev.*, 133(5), 348-358. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.03.013>
- Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2013). Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb Cell Fact*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-1>
- Orozco, H., Sepulveda, A., Picazo, C., Matallana, E., y Aranda, A. (2016). RNA binding protein Pub1p regulates glycerol production and stress tolerance by controlling Gpd1p activity during winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(11), 5017-5027. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7340-z>
- Ough, C. S. (1992). Winemaking Basics. En *Winemaking Basics*. <https://doi.org/10.1201/9780203733752>
- Ough, C. S., y Amerine, M. A. (1988). *Nitrogen compounds. Methods for analysis of must and wines* (2nd ed.; University of California, Ed.). John Wiley and Sons Ltd.
- Park, J. I., Grant, C. M., y Dawes, I. W. (2005). The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: Involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327(1), 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.019>
- Parks, L. W., y Casey, W. M. (1995). Physiological Implications of Sterol Biosynthesis in Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49(1), 95-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.000523>
- Parrou, J. L., y François, J. (1997). A Simplified Procedure for a Rapid and Reliable Assay of both Glycogen and Trehalose in Whole Yeast Cells. *Anal. Biochem.*, 248(1), 186-188. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2138>
- Pascual-Ahuir, A., y Proft, M. (2007a). Control of stress-regulated gene expression and longevity by the Sch9 protein kinase. *Cell Cycle*, Vol. 6, pp. 2445-2447. <https://doi.org/10.4161/cc.6.20.4792>
- Pascual-Ahuir, A., y Proft, M. (2007b). The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J.*, 26(13), 3098-3108. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601756>
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., y De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA Signaling Pathways Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G0. *Mol. Cell*, 12(6), 1607-1613. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00485-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00485-4)
- Peeters, K., Leemputte, F. Van, Fischer, B., Bonini, B. M., Quezada, H., Tsytlonok, M., Haesen, D., Vanthienen, W., Bernardes, N., Bravo Gonzalez-Blas, C., Janssens, V., Tompa, P., Versées, W., y Thevelein, J. M. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nat. Commun.*, (8). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01019-z>

- Peltier, E., Bernard, M., Trujillo, M., Prodhomme, D., Barbe, J.-C., Gibon, Y., y Marullo, P. (2018). Wine yeast phenomics: A standardized fermentation method for assessing quantitative traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains in enological conditions. *PLoS One*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190094>
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J. M., y Matallana, E. (2005). Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 6831-6837. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6831-6837.2005>
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C., y Matallana, E. (2009). Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microb. cell Physiol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1722-9>
- Peris, D., Moriarty, R. V., Alexander, W. G., Baker, E. C., Sylvester, K., Sardi, M., ... Hittinger, C. T. (2017). Hybridization and adaptive evolution of diverse *Saccharomyces* species for cellulosic biofuel production. *Biotechnol. Biofuels*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0763-7>
- Peter, J. J., Watson, T. L., Walker, M. E., Gardner, J. M., Lang, T. A., Borneman, A. R., Forgan, A., Tran, T., y Jiranek, V. (2018). Use of a wine yeast deletion collection reveals genes that influence fermentation performance under low-nitrogen conditions. *FEMS Yeast Res.*, 18(3). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy009>
- Picazo, C., Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2015). Interplay among Gcn5, Sch9 and mitochondria during chronological aging of wine yeast is dependent on growth conditions. *PLoS One*, 10(2), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117267>
- Pizarro, F., Jewett, M. C., Nielsen, J., y Agosin, E. (2008). Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(20), 6358-6368. <https://doi.org/10.1128/AEM.00602-08>
- Pizarro, F., Vargas, F. A., y Agosin, E. (2007). A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*, 24, 1-25. <https://doi.org/DOL: 10.1002/yea.1545>
- Polish, J. A., Kim, J. H., y Johnston, M. (2005). How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*, 169(2), 583-594. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034512>
- Portela, P., Howell, S., Moreno, S., y Rossi, S. (2002). In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, 277(34), 30477-30487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201094200>
- Powers, R. W., Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., y Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.*, 20(2), 174-184. <https://doi.org/10.1101/gad.1381406>
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Pringle, J. R. (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with Calcofluor. *Methods Enzymol.*, 194(C), 732-735. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94055-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94055-H)

- Puig, S., Querol, A., Barrio, E., y Pérez-Ortí, J. E. (2000). Mitotic Recombination and Genetic Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), 2057-2061.
- Rachidi, N., Barre, P., y Blondin, B. (1999). Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG*, 261(4-5), 841-850. <https://doi.org/10.1007/s004380050028>
- Rai, R., Tate, J. J., Georis, I., Dubois, E., y Cooper, T. G. (2014). Constitutive and nitrogen catabolite repression-sensitive production of Gat1 isoforms. *J. Biol. Chem.*, 289(5), 2918-2933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516740>
- Rai, R., Tate, J. J., Shanmuganatham, K., Howe, M. M., Nelson, D., y Cooper, T. G. (2015). Nuclear Gln3 import is regulated by nitrogen catabolite repression whereas export is specifically regulated by glutamine. *Genetics*, 201(3), 989-1016. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177725>
- Ralser, M., Wamelink, M. M., Struys, E. A., Joppich, C., Krobisch, S., Jakobs, C., y Lehrach, H. (2008). A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(46), 17807-17811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803090105>
- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E., y Young, E. T. (2009). Snf1 Controls the Activity of Adr1 Through Dephosphorylation of Ser230. *Genet. Soc. Am.*, 182, 735-745. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.103432>
- Ratnakumar, S., y Young, E. T. (2010). Snf1 dependence of peroxisomal gene expression is mediated by Adr1. *J. Biol. Chem.*, 285(14), 10703-10714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079848>
- Reid, R. J. D., Lisby, M., y Rothstein, R. (2002). Cloning-free genome alterations in *Saccharomyces cerevisiae* using adaptamer-mediated PCR. *Methods Enzymol.*, Vol. 350, pp. 258-277. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50968-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50968-X)
- Remize, F., Andrieu, E., y Dequin, S. (2000). Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(8), 3151-3159. Recuperado de <http://genome-www.stanford.edu>
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L., y Dequin, S. (2003). Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd I p and is only partially controlled by the HOG pathway. *Yeast*, 20(15), 1243-1253. <https://doi.org/10.1002/yea.1041>
- Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P., y Dequin, S. (1999). Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(1), 143-149.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., y Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology*. <https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Riou, C., Nicaud, J. M., Barre, P., y Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast*, 13(10), 903-15. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199708\)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199708)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1) [pii]\r10.1002/(SICI)1097-0061(199708)13:10<903::AID-YEA145>3.0.CO;2-1

- Roberg, K. J., Bickel, S., Rowley, N., y Kaiser, C. A. (1997). Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics*, 147(4), 1569-1584.
- Robertson, L. S., y Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(23), 13783-13787. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13783>
- Robyt, J. F., y Whelan, W. J. (1972). Reducing value methods for maltodextrins. *Anal. Biochem.*, 45(2), 510-516. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90213-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90213-8)
- Rødkaer, S. V., y Faergeman, N. J. (2014). Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 14(5), 683-696. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12157>
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J. M., De Virgilio, C., De Moor, B., y Winderickx, J. (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol. Microbiol.*, 55(3), 862-880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04429.x>
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., y Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20(16), 1369-1385. <https://doi.org/10.1002/yea.1046>
- Rossignol, T., Kobi, D., Jacquet-Gutfreund, L., y Blondin, B. (2009). The proteome of a wine yeast strain during fermentation, correlation with the transcriptome. *J. Appl. Microbiol.*, 107(1), 47-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04156.x>
- Roustan, J. L., y Sablayrolles, J. M. (2004). Role of trehalose and glycogen in alcoholic fermentation in wine-making conditions. *J. Wine Res.*, 15(3), 189-202. <https://doi.org/10.1080/09571260500109285>
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (3rd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santangelo, G. M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(1), 253-282. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006>
- Santhanam, A., Hartley, A., Düvel, K., Broach, J. R., y Garrett, S. (2004). PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot. Cell*, 3(5), 1261-1271. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1261-1271.2004>
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., y Wigler, M. (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* (heat shock/yeast RAS2VII9 gene/suppressor/PDE2 gene). En *Biochemistry* (Vol. 83). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387126/pdf/pnas00328-0038.pdf>
- Schepers, W., Van Zeebroeck, G., Pinkse, M., Verhaert, P., y Thevelein, J. M. (2012). In Vivo Phosphorylation of Ser 21 and Ser 83 during Nutrient-induced Activation of the Yeast Protein Kinase A (PKA) Target Trehalase. *J. Biol. Chem.*, 287(53), 44130-44142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421503>
- Scherens, B., Feller, A., Vierendeels, F., Messenguy, F., y Dubois, E. (2006). Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS Yeast Res.*, 6(5), 777-791. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00060.x>

- Serra-Cardona, A., Petrezselyova, S., Canadell, D., Ramos, J., y Arino, J. (2014). Coregulated Expression of the Na<sup>+</sup>/Phosphate Pho89 Transporter and Ena1 Na<sup>+</sup>-ATPase Allows Their Functional Coupling under High-pH Stress. *Mol. Cell. Biol.*, 34(24), 4420-4435. <https://doi.org/10.1128/MCB.01089-14>
- Shimizu, J., Okumura, Y., Yoda, K., y Yamasaki, M. (2008). A glutamine synthetase mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows defect in cell wall. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43(3), 157-162. <https://doi.org/10.2323/jgam.43.157>
- Sicard, D., y Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.*, 334(3), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016>
- Sidoux-Walter, F., Pettersson, N., y Hohmann, S. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqy1 is involved in sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(50), 17422-17427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404337101>
- Simpson-Lavy, K., Xu, T., Johnston, M., y Kupiec, M. (2017). The Std1 Activator of the Snf1/AMPK Kinase Controls Glucose Response in Yeast by a Regulated Protein Aggregation. *Mol. Cell*, 68(6), 1120-1133.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.016>
- Smets, B., De Snijder, P., Engelen, K., Joossens, E., Ghillebert, R., Thevissen, K., Marchal, K., y Winderickx, J. (2008). Genome-wide expression analysis reveals TORC1-dependent and -independent functions of Sch9. *FEMS Yeast Res.*, 8(8), 1276-1288. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00432.x>
- Smith, A., Ward, M. P., y Garrett, S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17(13), 3556-3564. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3556>
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., y Hall, M. N. (2010). The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase a Toward Some But Not All Substrates. *Mol. Biol. Cell*, 21(2), 3475-3486. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0182>
- Stanbrough, M., y Magasanik, B. (1996). Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of GAP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 178(8), 2465-2468. <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2465-2468.1996>
- Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P. J., Rogers, P., y Stanley, G. A. (2010). Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37(2), 139-149. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0655-3>
- Staschke, K. A., Dey, S., Zaborske, J. M., Reddy Palam, L., McClintick, J. N., Pan, T., Edenberg, H. J., y Wek, R. C. (2010). *Integration of General Amino Acid Control and Target of Rapamycin (TOR) Regulatory Pathways in Nitrogen Assimilation in Yeast* \* □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121947>
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M. P., Voordeckers, K., y Verstrepen, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 38, 947-995. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073>
- Steinkraus, K. A., Kaeberlein, M., y Kennedy, B. K. (2008). Replicative Aging in Yeast: The Means to the End. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 24(1), 29-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123509>

- Stracka, D., Jozefczuk, S., Rudroff, F., Sauer, U., y Hall, M. N. (2014). Nitrogen source activates TOR (Target of Rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *J. Biol. Chem.*, 289(36), 25010-25020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574335>
- Strathern, J. N., Klar, A. J. S., Hicks, J. B., Abraham, J. A., Ivy, J. M., Nasmyth, K. A., y McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell*, 31(1), 183-192. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90418-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90418-4)
- Su, Y., Gamero, A., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Querol, A., y Guillamón, J. M. (2019). Interspecific hybridisation among diverse *Saccharomyces* species: A combined biotechnological solution for low-temperature and nitrogen-limited wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108331>
- Sutphin, G. L., y Kaeberlein, M. (2011). Comparative genetics of aging. En *Handbook of the Biology of Aging* (Seventh Ed). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378638-8.00010-5>
- Tabera, L., Munoz, R., y Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* Genome Is Semidominant and Induces Autolytic Phenotypes Suitable for Improvement of Sparkling Wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2351-2358. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2351-2358.2006>
- Taherzadeh, M. J., Adler, L., y Lidén, G. (2002). Strategies for enhancing fermentative production of glycerol-a review. *Enzyme Microb. Technol.*, 31(1-2), 53-66. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00069-8)
- Tate, J. J., y Cooper, T. G. (2013). Five conditions commonly used to down-regulate tor complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes. *J. Biol. Chem.*, 288(38), 27243-27262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484386>
- Tate, J. J., Georis, I., Feller, A., Dubois, E., y Cooper, T. G. (2009). Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *J. Biol. Chem.*, 284(4), 2522-2534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806162200>
- Tate, J. J., Rai, R., y Cooper, T. G. (2005). Methionine sulfoximine treatment and carbon starvation elicit Snf1-independent phosphorylation of the transcription activator Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280(29), 27195-27204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504052200>
- Tate, J. J., Rai, R., y Cooper, T. G. (2015). Nitrogen starvation and TorC1 inhibition differentially affect nuclear localization of the Gln3 and Gat1 transcription factors through the rare glutamine tRNA<inf>CUG</inf>in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 199(2), 455-474. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173831>
- Team R. Core. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. 0, 201. <https://doi.org/10.1108/eb003648>
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., y Blondin, B. (2013). Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLoS One*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>

- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D., Rolland, F., Teunissen, A., Van Dijck, P., Versele, M., Wera, S., y Winderickx, J. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, 26(9-10), 819-825. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00177-0)
- Thornton, R. J., y Eschenbruch, R. (1976). Homothallism in wine yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 42(4), 503-509. <https://doi.org/10.1007/BF00410181>
- Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., y Dequin, S. (2014). Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* under Hyperosmotic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(8), 2623-2632. <https://doi.org/10.1128/aem.03710-13>
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G., y Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 7(4), 1371-1377. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.4.1371>
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., y Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2), 277-287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., y Wigler, M. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, 40(1), 27-36. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90305-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90305-8)
- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J. M., y Olsson, L. (2010). Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37(11), 1211-1220. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0768-8>
- Treitel, M. A., Kuchin, S., y Carlson, M. (1998). Snf1 Protein Kinase Regulates Phosphorylation of the Mig1 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 18(11), 6273-6280. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6273>
- Trindade de Carvalho, B., Holt, S., Souffriau, B., Lopes Brandão, R., Foulquié-Moreno, M. R., y Thevelein, J. M. (2017). Identification of Novel Alleles Conferring Superior Production of Rose Flavor Phenylethyl Acetate Using Polygenic Analysis in Yeast. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01173-17>
- Tronchoni, J., Curiel, J. A., Sáenz-Navajas, M. P., Morales, P., de-la-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., y Gonzalez, R. (2018). Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.*, 70, 214-223. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.10.008>
- Turner, J. J., Ewald, J. C., y Skotheim, J. M. (2012). Cell Size Control in Yeast. *Curr. Biol.*, 22(9), R350-R359. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.041>
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J. R., De Virgilio, C., Hall, M. N., y Loewith, R. (2007). Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, 26(5), 663-674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.020>



- Valadi, Å., Granath, K., Gustafsson, L., y Adler, L. (2004). Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J. Biol. Chem.*, 279(38), 39677-39685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403310200>
- Valamoti, S. M., Mangafa, M., Koukouli-Chrysanthaki, C., y Malamidou, D. (2007). Grapepressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? *Antiquity*, 81(311), 54-61. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00094837>
- Valenzuela, L., Aranda, C., y González, A. (2001). TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.*, 183(7), 2331-2334. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2331-2334.2001>
- Vallejo, B., Orozco, H., Picazo, C., Matallana, E., y Aranda, A. (2017a). Sch9p kinase and the Gcn4p transcription factor regulate glycerol production during winemaking. *FEMS Yeast Res.*, 17, 106. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow106>
- Vallejo, B., Picazo, C., Orozco, H., Matallana, E., y Aranda, A. (2017b). Herbicide glufosinate inhibits yeast growth and extends longevity during wine fermentation. *Sci. Rep.*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12794-6>
- van Oevelen, C. J. C. (2006). Snf1p-dependent Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) Recruitment and Chromatin Remodeling Activities on the HXT2 and HXT4 Promoters. *J. Biol. Chem.*, 281(7), 4523-4531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509330200>
- Vanegas, J. M., Contreras, M. F., Faller, R., y Longo, M. L. (2012). Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. *Biophys. J.*, 102(3), 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.038>
- Varlakhanova, N. V., Tornabene, B. A., y Ford, M. G. J. (2018). Feedback regulation of TORC1 by its downstream effectors Npr1 and Par32. *Mol. Biol. Cell*, 29(22), 2751-2765. <https://doi.org/10.1091/mbc.e18-03-0158>
- Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., y Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 Is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of mig1 protein repressor complex. *J. Biol. Chem.*, 291(14), 7267-7285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>
- Versele, M., De Winde, J. H., y Thevelein, J. M. (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J.*, 18(20), 5577-5591. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5577>
- Viana, T., Loureiro-Dias, M. C., y Prista, C. (2014). Efficient fermentation of an improved synthetic grape must by enological and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 4(16), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0016-0>
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., y Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific  $\beta$  subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.*, 15(9), 1104-1114. <https://doi.org/10.1101/gad.879301>
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., y Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African J. Enol. Vitic.*, 27(2). <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>

- Wach, A., Brachat, A., Alberti-segui, C., Rebischung, C., y Philippsen, P. (1997). Heterologous HIS3 Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13, 1065-1075. Recuperado de papers3://publication/uuid/AE46E5B8-C4C5-4888-8184-50B87E25CEEE
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., y Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 1793-1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>
- Walker, M. E., Gardner, J. M., Vystavelova, A., McBryde, C., De Barros Lopes, M., y Jiranek, V. (2003). Application of the reuseable, KanMX selectable marker to industrial yeast: construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences. *FEMS Yeast Res.*, 4, 339-347. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00161-2)
- Walker, M. E., Nguyen, T. D., Liccioli, T., Schmid, F., Kalatzis, N., Sundstrom, J. F., Gardner, J. M., y Jiranek, V. (2014). Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-552>
- Wang, H., Wang, X., y Jiang, Y. (2003). Interaction with Tap42 Is Required for the Essential Function of Sit4 and Type 2A Phosphatases. *Mol. Biol. Cell*, 14(11), 4342-4351. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0072>
- Wanke, V., Cameroni, E., Uotila, A., Piccolis, M., Urban, J., Loewith, R., y De Virgilio, C. (2008). Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol. Microbiol.*, 69(1), 277-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06292.x>
- Wei, M., Fabrizio, P., Madia, F., Hu, J., Ge, H., Li, L. M., y Longo, V. D. (2009). Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet.*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000467>
- Wiemken, A., y Dürr, M. (1974). Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 101(1), 45-57. <https://doi.org/10.1007/BF00455924>
- Wild, A., y Wendler, C. (1993). Inhibitory action of glufosinate on photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, 48(3-4), 369-373. <https://doi.org/10.1515/znc-1993-3-441>
- Wilson, R. B., y Tatchell, K. (1988). SRA5 encodes the low-Km cyclic AMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 8(1), 505-510. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.1.505>
- Xie, M. W., Jin, F., Hwang, H., Hwang, S., Anand, V., Duncan, M. C., y Huang, J. (2005). Insights into TOR function and rapamycin response: Chemical genomic profiling by using a high-density cell array method. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(20), 7215-7220. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500297102>
- Xu, X., Williams, T. C., Divne, C., Pretorius, I. S., y Paulsen, I. T. (2019). Evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a TRK1-dependent potassium influx mechanism for propionic acid tolerance. *Biotechnol. Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1427-6>
- Yang, R., Wek, S. A., y Wek, R. C. (2000). Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 20(8), 2706-2717. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.8.2706-2717.2000>

- Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., Boone, C., Ammerer, G., Baranov, P. V., y Loewith, R. (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 27(2), 397-409. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0594>
- Ying, G.-G., y Williams, B. (1999). Herbicide residues in grapes and wine. *J. Environ. Sci. Heal. Part B*, 34(3), 397-411. <https://doi.org/10.1080/03601239909373205>
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., y Shimizu, H. (2009). Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 9(1), 32-44. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00456.x>
- You, K. M., Rosenfield, C. L., y Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3), 1499-1503. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003>
- Yuan, W., Guo, S., Gao, J., Zhong, M., Yan, G., Wu, W., Chao, Y., y Jiang, Y. (2017). General control nonderepressible 2 (GCN2) kinase inhibits target of rapamycin complex 1 in response to amino acid starvation in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 292(7), 2660-2669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772194>
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X., y Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annu. Rev. Genet.*, 42(1), 27-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130206>
- Zeyl, C. (2004). Capturing the adaptive mutation in yeast. *Res. Microbiol.*, Vol. 155, pp. 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.12.006>
- Zhang, W., Du, G., Zhou, J., y Chen, J. (2018). *Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in Saccharomyces cerevisiae*.
- Zhang, A., Shen, Y., Gao, W., y Dong, J. (2011). Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 585(19), 3026-3032. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.023>
- Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D. J., y Marullo, P. (2014). QTL dissection of lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. *PLoS One*, 9(1), e86298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086298>
- Zimmermann, F. K., y Eaton, N. R. (1974). Genetics of induction and catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Mol. Gen. Genet.*, 134(3), 261-272. <https://doi.org/10.1007/BF00267720>
- Zurita-Martinez, S. A., y Cardenas, M. E. (2005). Tor and Cyclic AMP-Protein Kinase A: Two Parallel Pathways Regulating Expression of Genes Required for Cell Growth. *Eukaryot. Cell*, 4(1), 63-71. <https://doi.org/10.1128/ec.4.1.63-71.2005>
- Zuzuarregui, A., y del Olmo, M. (2004). Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(4), 271-280. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020162.21248.53>
- Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., y Del Olmo, M. L. (2006). Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(1), 836-847. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.836-847.2006>

## **ANEXO I - ABREVIATURAS**

---



## **ANEXO I**

Las abreviaturas utilizadas a lo largo de este trabajo se detallan a continuación:

<b>2DG</b>	2-desoxiglucosa
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AT</b>	3-amino-1, 2, 4-triazol
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AzaLeu</b>	4-aza-D,L-leucina
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>cRNA</b>	RNA complementario
<b>CSRE</b>	Elementos de respuesta a fuente de carbono ( <i>Carbon Source Response Elements</i> )
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DT</b>	Desviación Típica
<b>EDTA</b>	Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
<b>ERC</b>	Moléculas de DNA circulares autoreplicativas ( <i>Extrachromosomal Replicative Circles</i> )
<b>GA</b>	Glufosinato de amonio
<b>GAAC</b>	Control general de aminoácidos ( <i>General Amino Acid Control</i> )
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GlcN</b>	Glucosamina
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HOG</b>	Elevada osmolaridad por glicerol ( <i>High Osmolarity Glycerol</i> )
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico ( <i>Heat Shock Protein</i> )
<b>LC</b>	Longevidad cronológica
<b>LR</b>	Longevidad replicativa
<b>LSA</b>	Levadura Seca Activa
<b>mA</b>	miliAmperio
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MS300</b>	Mosto Sintético 300 mg/L de YAN
<b>MS60</b>	Mosto Sintético 60 mg/L de YAN
<b>MSX</b>	L-metionina sulfoximina
<b>mV</b>	miliVoltios
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido reducido
<b>NCR</b>	Represión catabólica por nitrógeno ( <i>Nitrogen Catabolite Repression</i> )
<b>NS:Low</b>	Condición de vinificación en estático y concentración de nitrógeno limitante
<b>NS:Normal</b>	Condición de vinificación en estático y concentración de nitrógeno adecuada
<b>ORF</b>	Pauta de lectura abierta ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>pb</b>	pares de bases

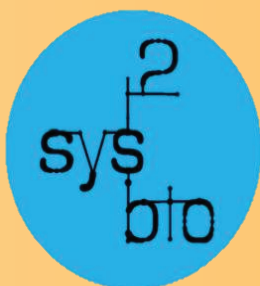
<b>PCA</b>	<i>Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de cAMP
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RTG</b>	Ruta retrógrada
<b>S:Normal</b>	Condición de vinificación en agitación y concentración de nitrógeno adecuada
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SM</b>	Sulfometuronmetil
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un único nucleótido ( <i>Single Nucleotide Polimorphism</i> )
<b>STRE</b>	Elemento de respuesta a estrés ( <i>Stress Response Element</i> )
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic acid</i> )
<b>TOR</b>	Diana de la rapamicina ( <i>Target Of Rapamycin</i> )
<b>TORC1</b>	Complejo 1 de TOR
<b>TORC2</b>	Complejo 2 de TOR
<b>Tris</b>	Tris hidroximetil aminometano
<b>U</b>	Unidad
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>u.f.c.</b>	Unidades Formadoras de Colonia
<b>UFA</b>	Ácidos grasos insaturados ( <i>Unsaturated Fatty Acids</i> )
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas ( <i>Unfolded Protein Response</i> )
<b>UTR</b>	Región no traducida ( <i>Untranslated Region</i> )
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>YAN</b>	Nitrógeno asimilable por levadura ( <i>Yeast Assimilable Nitrogen</i> )
<b>μMAX</b>	Velocidad máxima de crecimiento





La fermentación alcohólica del vino es llevada a cabo principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, de ahí la gran importancia de conocer cómo afectan los nutrientes presentes en el mosto de uva a su crecimiento y supervivencia, igual que otros factores ambientales y genéticos. Si la levadura no presenta los nutrientes adecuados, o es incapaz de utilizarlos, se producen paradas o ralentizaciones de la fermentación que dan lugar a grandes pérdidas económicas. Este trabajo se centra en el estudio de las diferentes rutas de señalización de nutrientes en condiciones de vinificación con la finalidad de determinar cómo las cepas vínicas son capaces de hacer frente a las condiciones adversas que conlleva la vinificación.

El estudio realizado sugiere que no existe una dicotomía entre la señalización de fuentes de carbono y nitrógeno. La comunicación cruzada entre las diversas rutas de señalización de nutrientes permite regular adecuadamente el metabolismo celular para adecuarse a las condiciones ambientales.



iata

